



Desenvolvimento de bolachas isentas de glúten com farinha de arroz e *Spirulina*

Andreia Filipa Inácio Miranda

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientadores:

Doutora Ana Paula dos Santos Batista

Doutora Professora Anabela Raymundo

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com Agregação, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais:

Doutora Isabel Maria Nunes de Sousa, Professora Associada com Agregação, Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Doutora Ana Paula dos Santos Batista, Investigadora, Institut National de la Recherche Agronomique.

Agradecimentos

Primeiro, aos meus pais, Sílvia e Mário por me terem proporcionado a realização deste curso de 5 anos, por todo o incentivo, apoio e carinho.

À minha orientadora, Doutora Ana Paula Batista pelo enorme apoio, conhecimento, motivação e disponibilidade disponibilizados durante todo o processo.

À professora Patrícia Fradinho por todo o apoio na fase de laboratório, assim como à professora Anabela Raymundo por me ter ajudado inúmeras vezes no laboratório de reologia.

Ao Professor Mário Tredici e ao Doutor Alberto Niccolai do DISPAA da Universidade de Florença pela cedência da biomassa de microalga, assim como pela possibilidade de colaboração nesta parceria.

À Ivana Bursic pela troca de experiências intercultural e pelo seu acompanhamento durante os primeiros meses no laboratório (Thank you for all your advice and friendship during the first couple months in the lab!).

Aos técnicos de laboratório, Daniel Duarte e Diana Faria, por me terem ajudado no manuseamento dos equipamentos sempre que precisei, assim como aos estagiários Hélder Fernandes e Rita Teixeira da escola profissional do Pinhal Novo, por toda o auxílio na realização dos testes de caracterização química.

Aos meus amigos que sempre me apoiaram ao longo deste percurso: Inês Figueiredo, Sofia Santos, Maria Bentes, Joana Duarte, Ricardo Clemente e Ricardo Miranda.

Este trabalho foi financiado por fundos nacionais da Fundação para a Ciência e Tecnologia através da Unidade de Investigação LEAF - *Linking Landscape, Environment Agriculture and Food* (UID/AGR/04129/2013).

Este trabalho não poderia ter sido realizado sem o apoio de todas estas pessoas e entidades, por isso muito obrigada!

Resumo

No mundo atual em que vivemos, assistimos a uma crescente procura de alimentos saudáveis, sem glúten, práticos e com propriedades funcionais. O objetivo deste estudo foi desenvolver bolachas isentas de glúten, doces e salgadas, com incorporação de diferentes concentrações de *Spirulina (Arthrospira) platensis* F&M-C256 (0%, 1%, 2%, 4% e 6% m/m). Desenvolveram-se várias formulações de bolachas doces e salgadas a partir de formulações base previamente otimizadas, em que se substituiu a farinha de trigo por farinha de arroz. No caso das bolachas doces foi também estudado diferentes concentrações de farinha de arroz (38 a 47% m/m), enquanto nas bolachas salgadas houve necessidade de adicionar um emulsionante (lecitina de soja), para que o produto final se aproxima-se o mais possível dos produtos-alvo à base de trigo. Foram analisadas características como a cor, a textura e a atividade da água, sendo que com o aumento do teor de *Spirulina*, as bolachas ficaram mais escuras, e com menor cromaticidade (L^* , a^* , b^*). Em relação à textura as bolachas com incorporação de *Spirulina* revelaram maior firmeza e ao reduzir o teor de farinha de arroz, esta diminuiu. Relativamente à atividade da água, todas as bolachas apresentaram valores inferiores a 0,5. Em relação às propriedades reológicas das massas (antes da cozedura), verificou-se que para todas as formulações analisadas, o módulo G' era superior ao módulo G'' , o que traduz um comportamento predominantemente elástico. As formulações de bolachas doces 6% *Spirulina* e 47% Farinha de arroz apresentaram valores de G' significativamente ($p < 0,05$) mais altos que as restantes formulações, o que se traduz numa maior estruturação. No estudo da diminuição do teor de farinha de arroz foi possível reduzir de 47% para 42% (m/m), de modo a manter os valores de G' e G'' semelhantes aos da massa controlo de trigo (produto-alvo). A composição química denotou uma maior diferença no teor proteico, observando-se um aumento significativo ($p < 0,05$) entre as bolachas controlo e as bolachas com 2% de *Spirulina*, aumentando de 5,4 para 6,7 g/100g nas bolachas doces e de 7,7 para 9,9 g/100g nas bolachas salgadas.

Palavras-chave: Bolachas; *Spirulina*; Farinha de Arroz; Sem glúten; Reologia.

Abstract

Accordingly to the world we live, we are facing an increase in healthy, gluten-free, practical and with functional properties food's demand. The aim of this study was the development of sweet biscuits and crackers enriched with different concentrations of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* F&M-C256 biomass (0%, 1%, 2%, 4% e 6% w/w) and rice flour (38%, 40%, 42%, 44% e 47% w/w) only in sweet biscuits. Colour, texture and water activity were analysed and the biscuits became darker, less greener and less yellow with *Spirulina*'s content increase. Biscuits enriched with *Spirulina* and with more content of rice flour showed higher values of hardness. All biscuits showed water activity values below 0.5. The rheological characterization of the doughs (before cooking) has also showed that G' was higher than G'' for all formulations analyse, revealing a mainly elastic behavior. Formulations of sweet biscuits 6% *Spirulina* and 47% Rice flour presented G' values significant ($p < 0,05$) higher, which translates into a great structuring. In the study of reducing the rice flour content, it was possible to reduce from 47% to 42% (w/w), maintaining viscoelastic properties similar to the wheat control cookie dough (target-product). The results obtained in chemical composition analysis showed that protein content was the parameter which exhibited the most significant differences ($p < 0,05$), with an increase between control cookies and 2% *Spirulina* cookies, rising from 5,4 to 6,7 in sweet biscuits and from 7,7 to 9,9 in crackers.

Keywords: Biscuits; *Spirulina*; Colour; Texture; Rheology.

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	ii
Abstract	iii
Índice	1
Índice de figuras	3
Índice de tabelas.....	5
Introdução geral.....	6
Capítulo 1 – Revisão bibliográfica	8
1.1 Desenvolvimento de novos produtos	8
1.1.1 Doença celíaca e o glúten	9
1.1.2 Perspetivas sobre o mercado de produtos isentos de glúten.....	10
1.2 Bolachas.....	10
1.3 Ingredientes utilizados na produção de bolachas sem glúten	12
1.3.1 Arroz e farinha de arroz.....	12
1.3.2 Açúcar	15
1.3.3 Água.....	15
1.3.4 Fermento químico.....	16
1.3.5 Lecitina de soja	16
1.3.6 Óleo vegetal	16
1.3.7 Margarina	17
1.4 Alimentos funcionais	17
1.5 Microalgas	18
1.5.1 Cultivo das microalgas	20
1.5.2 Perspetivas sobre o mercado das microalgas	23
1.5.3 Aplicações das microalgas	23
1.5.4 Compostos bioativos presentes nas microalgas	24
1.5.5 <i>Arthrospira (Spirulina)</i>	27
Capítulo 2 – Materiais e métodos	30

2.1 Materiais	30
2.2 Métodos	31
2.2.1 Estudos da absorção de água e óleo da farinha de arroz	31
2.2.2 Preparação das bolachas	32
2.2.3 Caracterização física das bolachas	34
2.2.4. Caracterização reológica da massa das bolachas	38
2.2.5. Caracterização química das bolachas	40
2.2.5.1 Determinação do teor de cinzas totais das bolachas	40
2.2.5.2 Determinação do teor de gorduras totais das bolachas	41
2.2.5.3 Determinação do teor de proteína bruta das bolachas.....	41
2.2.5.4 Determinação do teor de fibra total das bolachas	42
2.2.6. Análise estatística.....	43
Capítulo 3 – Resultados e discussão.....	44
3.1 Estudos da absorção de água e óleo da farinha de arroz	44
3.2. Caracterização das bolachas (e massas) doces com <i>Spirulina</i> e farinha de arroz	45
3.2.1. Dimensões das bolachas doces	46
3.2.2. Cor das bolachas e das massas doces	47
3.2.3. Atividade da água e teor de humidade das bolachas doces	49
3.2.4. Análise do perfil de textura das bolachas doces	51
3.2.5. Caracterização reológica das massas das bolachas doces	54
3.3.Caracterização das bolachas (e massas) salgadas com <i>Spirulina</i> e farinha de arroz	59
3.3.1. Dimensões das bolachas salgadas	59
3.3.2. Cor das bolachas e das massas salgadas.....	60
3.3.3. Atividade da água e teor de humidade das bolachas salgadas.....	61
3.2.4. Análise do perfil de textura das bolachas salgadas	62
3.2.5. Caracterização reológica das massas das bolachas salgadas	63
3.4. Avaliação das características químicas das bolachas doces e salgadas com 2% de <i>Spirulina</i>	64
Capítulo 4 – Conclusões e proposta de trabalho de futuro	67

Referências bibliográficas	69
Anexos	74

Índice de figuras

Figura 1.1 Crackers de arroz comerciais de Itália (a), Tailândia e Austrália (c)	13
Figura 1.2 Área mundial de cultivo de arroz com casca (colunas azuis) e produção mundial de arroz com casca (linha laranja) (Fonte: Adaptado de FAO, 2017).	14
Figura 1.3 Representação de um grão de arroz (Fonte: adaptado de Ju e Vali, 2005).	15
Figura 1.4 Fluxograma da produção do arroz (Fonte: adaptado de Carrilho, 2014).	20
Figura 1.5 Pequena lagoa a céu aberto para cultivo de Spirulina, Asia (Fonte: Enzing et al., 2014).	21
Figura 1.6 Reator tubular horizontal na unidade de investigação do AlgaePARC da Wageningen UR NL (Fonte: Wageningen University & Research, 2017).	21
Figura 1.7 Fotoreator tubular em painel.	22
Figura 1.8 <i>Arthrospira</i> (<i>Spirulina</i>).	28
Figura 2.1 Preparação das bolachas salgadas Spirulina 2%.	33
Figura 2.2 Sistema cromático CIELAB (Fonte: adaptado de www.linocolor.com).	36
Figura 2.3 Colorímetro Minolta CR-400 (Japão).	36
Figura 2.4 Texturómetro TA-XT plus (a) e texturograma típico do teste de bending (b).	37
Figura 2.5 Medidor de aw HygroPalm HP23-AW (a) e Medidor de humidade PMB 202 (b). ..	37
Figura 2.6 Teste de varrimento de tensões.	38
Figura 2.7 Teste de varrimento de frequências.	38
Figura 2.8 Curvas de escoamento e respetivas curvas de viscosidade de fluidos Newtonianos (1), Reofluidificantes (2) e Reoespessantes (3) (Metzger, 2002).	39
Figura 3.1 Swelling power (a), capacidade de absorção de água (b), solubilidade (c) e water binding capacity (d) da farinha de arroz comercial.	44
Figura 3.2 Bolachas doces doce Controlo e com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	46
Figura 3.3 Diâmetro (a), espessura (b) e spread-ratio (c) obtidos para a bolacha doce Controlo e para as bolachas doces com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	47
Figura 3.4 Diâmetro (a), espessura (b) e spread-ratio (c) das bolachas doces com 2% de Spirulina e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%). A amostra	

“2% Spirulina”, corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig 3.3.	47
Figura 3.5 Parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^0 obtidos para a bolacha doce Controlo e para as bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	49
Figura 3.6 Parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^0 obtidos para as bolachas doces com incorporação de 2% de Spirulina e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%, 47%). A amostra “2% Spirulina” corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.5).	49
Figura 3.7 Teor de humidade (a) e atividade de água (a_w) (b) da bolacha doce controlo e das bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	51
Figura 3.8 Teor de humidade (a) e atividade de água (a_w) (b) das bolachas doces com 2% de Spirulina e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%, 47%). A amostra “2% Spirulina” corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.7).	51
Figura 3.9 Firmeza (a), área (b), fraturabilidade do teste de bending (c) e fraturabilidade do teste de penetração (d) da bolacha doce Controlo e das bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	53
Figura 3.10 Firmeza (a), área (b), fraturabilidade do teste de bending (c) e fraturabilidade do teste de penetração (d) das bolachas doces com 2% de Spirulina e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%). A amostra “2% Spirulina” corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.9).	53
Figura 3.11 Variação da firmeza (teste de bending) das bolachas doces com o aumento da concentração de farinha de arroz.	53
Figura 3.12 Espetro mecânico das massas das formulações de bolachas doces Controlo, 1% Spirulina, 2% Spirulina, 4% Spirulina e 6% Spirulina.	58
Figura 3.13 Espetro mecânico das massas das formulações de bolachas doces com 2% de Spirulina e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%, 47%). A amostra “2% Spirulina”, corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.12.	58
Figura 3.14 Valores de G' a 1 Hz para as formulações de bolachas doces Controlo, 1% Spirulina, 2% Spirulina, 4% Spirulina e 6% Spirulina.	58
Figura 3.15 Valores de G' para as formulações de bolachas doces com 2% de Spirulina e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%, 47%). A amostra “2% Spirulina”, corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.14.	58
Figura 3.16 Curvas de escoamento para as massas com formulação de bolachas doces Controlo, 1% Spirulina, 2% Spirulina, 4% Spirulina e 6% Spirulina.	58

Figura 3.17 Aspeto geral das bolachas salgadas Controlo e com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	59
Figura 3.18 Diâmetro (a), espessura (b) e spread-ratio (c) obtidos para a bolacha salgada Controlo e para as bolachas doces com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina....	59
Figura 3.19 Parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^0 obtidos para a bolacha salgada controlo e para as bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	60
Figura 3.20 Teor de humidade (a) e atividade de água (a_w) (b) da bolacha salgada Controlo e das bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	61
Figura 3.21 Firmeza (a), fraturabilidade do teste de bending (b), força (c), área (d) fraturabilidade do teste de penetração (e) da bolacha salgada controlo e das bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.....	62
Figura 3.22 Espectro mecânico das massas das formulações de bolachas salgadas Controlo, 1% Spirulina, 2% Spirulina) 4% Spirulina e 6% Spirulina.....	63
Figura 3.23 Valores de G' a 1 Hz para as formulações de bolachas salgadas Controlo, 1% Spirulina, 2% Spirulina, 4% Spirulina e 6% Spirulina.	64

Índice de tabelas

Tabela 1. Composição nutricional do arroz comum cru (Fonte: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2017).	14
Tabela 2. Características da margarina (Fonte: Portugal, 1998).	17
Tabela 3. Composição química da farinha de arroz e da microalga utilizada na preparação das bolachas (% m/m).	30
Tabela 4. Formulações de bolachas doces.	33
Tabela 5. Formulações de bolachas salgadas.....	34
Tabela 6. Variação de cor entre a massa e as bolachas doces com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	49
Tabela 7. Variação de cor entre a massa e as bolachas salgadas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de Spirulina.	61
Tabela 8. Composição química das bolachas doces controlo e com incorporação de 2% de Spirulina e das bolachas salgadas controlo e com incorporação de 2% de Spirulina.	67

Introdução geral

Muitos têm sido os esforços de incorporação de compostos bioativos utilizados como ingredientes funcionais em alimentos que possam ser consumidos regularmente, devido à crescente necessidade de aumentar o teor de nutrientes e compostos bioativos nestes mesmos alimentos (Torres *et al.*, 2014).

Devido ao aumento da população de indivíduos com sensibilidade ao glúten, a população em geral é influenciada na procura de alimentos sem glúten, mas que tenham características sensoriais semelhantes aos originais (Laureati *et al.*, 2012). A farinha de arroz é um ingrediente que pode ser utilizado na substituição da farinha de trigo, de forma a produzir bolachas isentas de glúten. O arroz é um cereal muito utilizado na panificação de produtos sem glúten devido a ser hipoalergénico, de sabor suave e de cor branca (Torres *et al.*, 2016). Em estudos anteriores realizados no Instituto Superior de Agronomia, utilizou-se farinha de arroz para desenvolver uma série de produtos isentos de glúten (e.g. massas, bases para pizzas, sobremesas, etc.) (Carrilho, 2014; Loureiro, 2015).

O mercado das microalgas tem vindo a crescer com perspectivas de crescimento a 10% ao ano, o que é bastante promissor para o desenvolvimento de produtos alimentares com incorporação destes microrganismos (Enzing *et al.*, 2014). A utilização das microalgas na alimentação humana tem vindo a ganhar cada vez mais espaço, devido aos seus inúmeros benefícios para a saúde, sendo uma fonte valiosa de vitaminas, carotenóides, proteínas, ácidos gordos, esteróis, polissacáridos, entre outros compostos bioativos (Gouveia *et al.*, 2007). A utilização de biomassa de microalgas em alimentos tem vindo a ser estudada há vários anos no Instituto Superior de Agronomia (e.g. Batista, 2012; Gouveia, 2008a, 2008b), tendo-se verificado um reforço nas propriedades reológicas. Este fato leva a crer que a utilização de microalgas, nomeadamente *Spirulina* (*Arthrospira maxima*) pode ser vantajosa no desenvolvimento de produtos sem glúten que usualmente apresentam uma estrutura e textura mais débeis e sensorialmente menos interessantes.

No âmbito desta dissertação, foram desenvolvidas bolachas doces e salgadas (tipo “crackers”) isentas de glúten, com farinha de arroz comercial e incorporação da microalga *Spirulina*. Os objetivos foram estudar a capacidade da *Spirulina* melhorar as propriedades reológicas e de textura dos produtos isentos de glúten (à base de arroz), tornando-os mais próximos dos produtos-alvo à base de farinha de trigo e incorporar o arroz como ingrediente, de modo a aproveitar um subproduto da indústria arroseira, numa lógica de economia circular. Para tal, realizaram-se diversas formulações de bolachas doces e salgadas (tipo “crackers”)

com diferentes concentrações de farinha de arroz e de *Spirulina*, com vista à otimização do processo de produção e das características físicas, químicas e organoléticas do produto final.

A presente tese encontra-se organizada em 4 capítulos. Precedendo o primeiro capítulo, existe uma introdução geral que apresenta a contextualização geral do trabalho bem como os objetivos do mesmo. O capítulo 1 apresenta a revisão bibliográfica sobre os principais temas relacionados com o tema da tese. O capítulo 2 apresenta os materiais e métodos envolvidos na realização desta tese. O capítulo 3 apresenta os resultados e discussão. No quarto e último capítulo encontram-se as conclusões, assim como as propostas de trabalho futuro.

O trabalho apresentado nesta tese será alvo de publicação na forma de artigo em revista científica internacional, tendo alguns dos resultados sido já apresentados em reuniões científicas, nomeadamente no Congresso Ibérico de Reologia (IBEREO 2017, Valencia, Espanha) e no Simpósio de Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura (SPASS 2017, Lisboa, Portugal). Os respetivos resumos dos trabalhos referenciados encontram-se no anexo 1:

- BATISTA, A.P.; BURSIC, I.; MIRANDA, A.; FRAGOSO, S.; FRADINHO, P.; RAYMUNDO, A.; SOUSA, I. (2017). Rheological characterization of *Spirulina* gluten-free cookie doughs. In “*The Multidisciplinary Science of Rheology – Towards a healthy and sustainable development*”, Eds. M.J. Hernández, T. Sanz, A. Salvador, F.J. Rubio-Hernández, R. Steinbruggen. pp. 20-23 (ISBN: 978-84-697-5123-7). (IBEREO 2017, Valencia, Espanha, 6 a 8 de Setembro). (Comunicação Oral).
- MIRANDA, A.; BATISTA, A.P.; RAYMUNDO, A.; SOUSA, I. (2017). Desenvolvimento de bolachas isentas de glúten com farinha de arroz e *Spirulina*. *4º Simpósio Nacional Promoção de uma Alimentação Saudável e Segura (SPASS2017) - do Nutriente à Embalagem: Inovação e Desafios*. (Lisboa, 21 Setembro) (Poster).

Capítulo 1 – Revisão bibliográfica

1.1 Desenvolvimento de novos produtos

As empresas alimentares estão sempre em busca de novos produtos para conseguirem sobreviver e obter lucro. Se estes produtos tiverem sucesso no mercado, dão uma nova vida às empresas ao substituir produtos que já não vendem bem. Todos os produtos têm um ciclo de vida e precisam de ser substituídos por outros novos (Fuller, 2011).

O desenvolvimento de novos produtos ou a procura de novos usos para produtos antigos, na indústria alimentar, é essencial para o contínuo crescimento das empresas. No entanto, existem outras formas de aumentar o lucro das empresas, muitas vezes sem a alocação de custos humanos, tecnológicos e financeiros que o investimento no desenvolvimento de novos produtos acarreta. Esta opção recai sobre a gestão de topo e depende da estratégia da empresa (Fuller, 2011).

Um novo produto alimentar é caracterizado como um produto que nunca foi apresentado antes em nenhum mercado. Isto é uma rara ocorrência. Um produto alimentar pode ser novo para a empresa, mas pode não ser novo para o mercado. Outras empresas podem ter vendido esse produto ou outro com um conceito semelhante (Fuller, 2011).

Assim, o conceito de novo produto tem duas definições: um produto nunca produzido antes pela empresa e introduzido no mercado existente ou num novo mercado (a); a apresentação ou *rebranding* de um produto pela empresa, numa nova forma, numa nova embalagem ou com uma nova marca num mercado que ainda não tinha sido explorado (b) (Fuller, 2011).

A autorização para a comercialização de novos alimentos e novos ingredientes alimentares (*Novel Foods*) é harmonizada na União Europeia (UE) pelo Regulamento (UE) nº 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de novembro de 2015 relativo a novos alimentos, que altera o Regulamento (UE) nº 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho e que revoga o Regulamento (CE) nº 258/97 do Parlamento, que altera o Regulamento UE nº 1169/2011 e revoga o anterior Regulamento (UE) n.º 258/97. Este regulamento aplica-se a alimentos e ingredientes alimentares que apresentam uma estrutura molecular primária nova (a); que consistam em microrganismos, fungos ou algas (b); que consistam ou que sejam isolados de plantas ou animais (c); ou aqueles cujo valor nutricional, metabolismo ou nível de substâncias indesejáveis tenham sido significativamente alteradas através do processo de produção.

Os alimentos comercializados em pelo menos um dos Estados-membros antes da entrada em vigor do Regulamento de Novos Alimentos a 15 de Maio de 1997 está no mercado

da UE sob a alçada do “princípio do reconhecimento mútuo”. Este é o caso da microalga *Arthrospira (Spirulina) platensis*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Aphanizomenon flosaquae* (uma alga filamentosa de cor azul-esverdeada originária de Klamath Lake, Oregon USA), de acordo com a DG Health and Consumer Protection, Novel Foods Catalogue (<http://ec.europa.eu/food/food/biotechnology/novelfood/>).

1.1.1 Doença celíaca e o glúten

A doença celíaca é uma doença autoimune caracterizada por uma permanente sensibilidade ao glúten que afeta o intestino delgado. As vilosidades do intestino tornam-se achatadas e inflamadas, dificultando a absorção de nutrientes, o que pode levar a dores abdominais, cólicas, inchaço e aumento do risco de linfoma (Lee e Newman, 2003).

Esta doença é uma das doenças genéticas humanas mais comuns, afetando 1 a 2% da população, com tendência para aumentar (Laureati *et al.*, 2012).

O único tratamento conhecido até à data é a adoção de uma dieta isenta de glúten, sendo a utilização de grãos que não contenham glúten essencial. Assim, os celíacos devem optar por ingerir grãos como a quinoa, amaranto, arroz selvagem, aveia e milho, sendo que a aveia ainda está em estudo (Laureati, *et al.* 2012; Lee e Newman, 2003).

No entanto, seguir este tratamento torna-se muitas vezes difícil para a população celíaca devido a várias razões. Primeiro, a maior parte dos produtos existentes no mercado têm por base cereais que possuem glúten, como o pão ou as massas, e os produtos substitutos que não contêm glúten normalmente possuem um elevado valor comercial. Segundo, mesmo produtos que aparentemente parecem não conter glúten podem contê-lo como aditivo na sua composição, sendo necessário uma leitura mais detalhada no rótulo do produto, o que requer algum conhecimento de nutrição e alguma autodisciplina. Por último, 20 a 38% dos celíacos têm deficiências nutricionais associadas, como défice em ferro, zinco, vitaminas B₆ e B₁₂ (Thompson *et al.*, 2005; Missbach *et al.*, 2015).

O glúten é uma rede proteica caracterizada pela capacidade de formação de estrutura em produtos de panificação, como o pão ou as bolachas. É responsável ainda pelas propriedades elásticas das massas e contribui para o aspeto geral do produto final. Está presente em cereais como o trigo e tem a capacidade de desenvolver uma rede viscoelástica capaz de reter CO₂, produzido durante o processo de fermentação (Torbica, *et al.*, 2012).

É um conjunto de proteínas específicas insolúveis e hidrofóbicas, as gliadinas, que são responsáveis pela viscosidade da massa e pelas propriedades fluidificantes. As gluteninas também são insolúveis e contribuem para a elasticidade da massa. Nem todas as farinhas, e portanto nem todas as massas, formam glúten. As farinhas sem glúten usualmente contêm

amido que assegura alguma estrutura, no entanto é o glúten que confere a maior estrutura às massas (Christian e Vaclavick, 2014).

Ao hidratar e manipular a farinha, as gliadinas e as gluteninas agregam-se e formam pontes de enxofre, criando uma rede de glúten que é coagulada depois do cozimento. Esta é uma estrutura tão forte que é capaz de ser esticada sem partir até um certo ponto. Deixar repousar a massa serve precisamente para que esta estrutura estabilize (Christian e Vaclavick, 2014).

Além do trigo, a rede de glúten pode ser formada noutros cereais derivados do trigo, contendo uma sequência específica de péptidos de aminoácidos (no centeio – as secalinas e na cevada – as hordeínas). Já outras farinhas como o arroz, o milho, a aveia e a soja não têm esta sequência de aminoácidos, portanto não formam rede de glúten. A aveia, no entanto, tem possibilidades de conter contaminações cruzadas com o trigo durante o seu transporte ou processamento, pelo que não deve ser consumida por doentes celíacos, a não ser que seja assegurado que a aveia não esteja contaminada (Lee e Newman, 2003; Christian e Vaclavick, 2014).

1.1.2 Perspetivas sobre o mercado de produtos isentos de glúten

Segundo Foodmanufacture (2017), o mercado dos produtos sem glúten está previsto crescer a uma taxa de crescimento maior do que nunca, sendo que em 2022 deverá valer cerca de 5 279 milhões de dólares. Os produtos de panificação sem glúten representaram metade das receitas do mercado em 2015. Avaliado em 3,13 milhões de dólares em 2015, o mercado tem uma perspetiva de crescimento anual de 7,8% de 2016 a 2022. Este crescimento pode ser explicado pelo aumento do número de mulheres trabalhadoras, assim como o aumento dos rendimentos disponíveis *per capita*. Outro dos motivos pode ser o aumento do conhecimento sobre a doença celíaca (Allied Market Research, 2017 *apud* Foodmanufacture, 2017). Deve notar-se também que existe uma tendência atual, em consumidores preocupados com a nutrição e saúde, em evitar produtos com glúten ainda que não possuam qualquer intolerância a este produto.

1.2 Bolachas

As bolachas são consumidas por pessoas de todas as idades. É um produto conveniente, de fácil consumo e transporte, sendo normalmente consumido como *snack*. É um alimento rico em energia, devido ao elevado teor em hidratos de carbono (Carrilho, 2014).

Mancebo *et al.* (2016) define as bolachas doces como sendo produtos de panificação que sofrem um processo de amassadura e cozedura e que contêm três ingredientes principais: farinha, açúcar e gordura.

As receitas das primeiras bolachas remontam ao tempo do antigo Egito e tinham como base trigo, água e mel. Estas serviam como símbolo de cortesia, em que eram oferecidas aos deuses do Egito como um presente para agradecer as boas colheitas e as cheias do rio Nilo, em cerimónias religiosas. Também eram oferecidas a familiares e amigos, tal como se faz hoje (Carrilho, 2014).

Existem diferentes tipos de bolachas consoante a sua composição, o modo de confeção da massa e os parâmetros de cozedura, dando origem a diferentes formas, cores, texturas, sabores e tamanhos. Algumas bolachas são crocantes, outras são mais macias, algumas mantêm a sua forma durante a cozedura e outras apresentam maior fator de expansão (Carrilho, 2014; Mancebo *et al.*, 2016).

As bolachas crocantes são caracterizadas pelo seu baixo teor de humidade e alto teor de gordura e açúcar, com baixo desenvolvimento da rede de glúten (Mancebo *et al.*, 2016).

A cozedura é um dos fatores que influencia a textura crocante das bolachas. Um forno de convecção ou um tempo longo de cozedura leva a uma maior evaporação da água. O armazenamento também é muito importante, pois se o produto absorver humidade, as bolachas perdem a textura crocante, passando a uma textura mais mole (Carrilho, 2014).

Devido ao baixo teor de humidade destas bolachas, a maior parte dos grânulos de amido não gelatiniza durante o processo de cozedura. E como o desenvolvimento da rede de glúten é baixo, abre-se a possibilidade para a confeção de bolachas feitas a partir de farinhas isentas de glúten, sem a necessidade de adição de substituintes do glúten. No entanto, farinhas isentas de glúten produzem bolachas com características físico-químicas diferentes das feitas com farinha de trigo, dependendo do tipo de cereal e do tipo de moagem (Mancebo *et al.*, 2016).

Nas bolachas, existem vários tipos de massa e métodos de moldagem, dando origem a uma classificação de 8 tipos de massas: “pingar com o saco de confeitar; pingar com o cortador; pingar com a colher; moldar antes de amassar; cortar antes da cozedura; cortar durante a cozedura; espalhar no tabuleiro e moldar depois da cozedura” (Carrilho, 2014).

O método mais utilizado é o método de cortar a massa antes da cozedura que consiste em dividir a massa e colocá-la no tabuleiro com a forma desejada. O ponto ideal da cozedura das bolachas é indicado pela cor até as bolachas ficarem douradas. O arrefecimento deve ser controlado, podendo ocorrer deformações como fissuras provocadas por correntes de ar frio.

O armazenamento deve ser feito após o arrefecimento total das bolachas (Carrilho, 2014).

No que toca às bolachas salgadas, o desafio é ainda maior, pois o desenvolvimento de bolachas tipo “crackers” requer, por um lado, um maior cuidado na laminação da massa para que esta fique com uma espessura mais fina, o que se torna mais difícil em massas sem glúten devido à sua fraca elasticidade e, por outro, a cozedura/evaporação da água torna-se uma etapa fundamental para que as bolachas adquiram a sua textura crocante, um atributo de qualidade fundamental para este tipo de produto. Por isso, recorre-se a uma etapa adicional de secagem a baixa temperatura de forma a garantir que a evaporação de água até valores de a_w muito baixos. É de notar que a maior parte das bolachas comerciais tipo *cracker* são sujeitas a uma fermentação biológica, no entanto no presente estudo, optou-se por realizar fermentação química por ser mais simples de controlar, dado o interesse no estudo da incorporação de *Spirulina*. Também é de referir que atualmente no mercado português encontram-se algumas bolachas doces sem glúten, no entanto as bolachas salgadas tipo *cracker* são quase inexistentes, havendo apenas o caso das tortitas de arroz tufado que possuem uma textura completamente diferente. Noutros mercados como em Itália, Tailândia e Austrália, por outro lado, já existem algumas destas bolachas (Figura 1.1):



Figura 1.1 Crackers de arroz comerciais Tailândia (b) e Austrália (a e c).

1.3 Ingredientes utilizados na produção de bolachas sem glúten

1.3.1 Arroz e farinha de arroz

O arroz (*Oryza sativa L.*) é um cereal consumido pelo ser humano há pelo menos 5000 anos e é cultivado em todos os continentes, exceto na Antártida. Atualmente representa, em média, 20% das quilocalorias ingeridas em todo o mundo. Na Ásia, o arroz proporciona 80% das quilocalorias ingeridas diariamente e 20% da proteína total consumida. A seguir ao milho, o arroz é o segundo cereal mais produzido em todo o mundo (Bao e Bergman, 2004; Briffaz *et al.*, 2012).

Em 2014, a área de cultivo mundial de arroz foi de aproximadamente 162,7 milhões de hectares, com uma produtividade mundial de 741,4 milhões de toneladas, sendo que a

maior região produtora é a Ásia, representando 90,5% do total de países produtores. Entre 2004 e 2014, observou-se um crescimento contínuo da produção, excetuando o período entre 2008 e 2009, em que houve uma ligeira queda (*Figura 1.2*) (FAO, 2017).

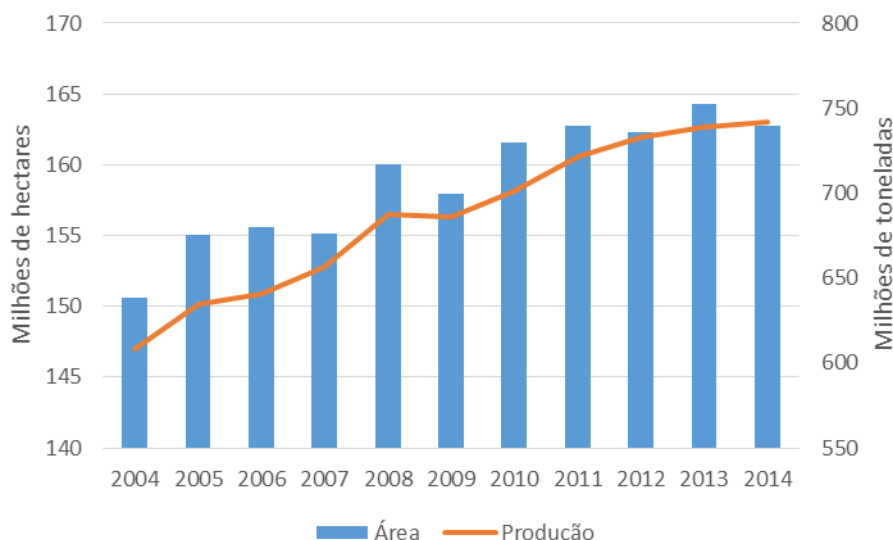


Figura 1.2 Área mundial de cultivo de arroz com casca (colunas azuis) e produção mundial de arroz com casca (linha laranja) (*Fonte: Adaptado de FAO, 2017*).

O arroz pode ser moído em farinha, sendo bastante utilizado na indústria de panificação devido à sua cor branca, boa digestibilidade, hipoalergénico, isento de glúten, de sabor suave e a sua forma nativa apresenta diferentes características funcionais (Bao e Bergman, 2004; Torres *et al.*, 2014).

O arroz é dividido em duas subespécies, *indica* e *japonica*. Ambas contêm genótipos que variam em relação ao teor de amido e às suas propriedades. O bago de arroz que é comprido, fino e que coze firme e macio é chamado de arroz *indica*. O bago de arroz que é curto, largo e que coze suave e viscoso é chamado de arroz *japonica*. Outras designações podem ser usadas no mercado, segundo as propriedades da textura e o uso culinário mais indicado. Deve ter-se em conta que dentro da mesma subespécie, existem genótipos que variam na forma do bago, textura do arroz cozido e propriedades do amido (Bao e Bergman, 2004).

O grão do arroz pode possuir várias cores, consoante o tipo e a concentração de polifenóis. Existem tipos de arroz que possuem o grão branco e outros que possuem grãos pretos ou roxos, dependendo da concentração de antocianinas. E existem outros que possuem o grão mais avermelhado devido à presença de taninos (Torres *et al.*, 2014).

Segundo Roy *et al.* (2011) as propriedades do arroz dependem do tipo de cultivar, do método de cultivo e de processamento e das condições de cozedura. O grão é composto, basicamente, por casca, pericarpo, endosperma e gérmen/embrião (Figura 1.3).

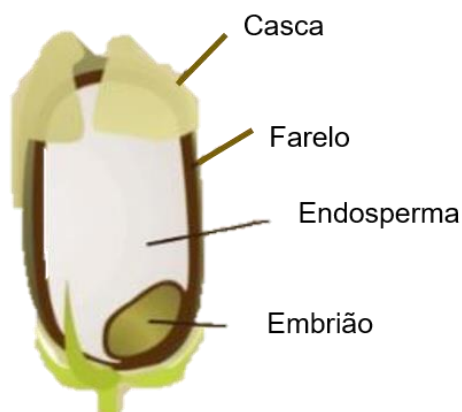


Figura 1.3 Representação de um grão de arroz (Fonte: adaptado de Ju e Vali, 2005).

Segundo a Tabela da Composição de Alimentos do Instituto Dr. Ricardo Jorge, a composição do arroz comum cru por 100g de produto, é a representada na Tabela 1 (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2017).

Tabela 1. Composição nutricional do arroz polido cru (Fonte: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 2017).

Componentes	Por 100 g de produto
Energia (Kcal)	352
Proteína (g)	6,7
Gordura total (g)	0,4
Total de hidratos de carbono (g)	78,1
Fibra alimentar (g)	2,1
Cinza (g)	0,5

A farinha de arroz pode conter entre 4,5 a 15,9% de proteína (Bao e Bergman, 2004; Torres *et al.*, 2014).

O polimento é o processo que elimina a casca e o farelo do grão de arroz, de modo a obter um grão branco, suficientemente polido, livre de impurezas e apto para consumo humano. Este procedimento requer o máximo de cuidado, de modo a reduzir o número de grãos partidos (Dhankhar, 2004).

O processo esquemático da produção de arroz está representado na Figura 1.4.

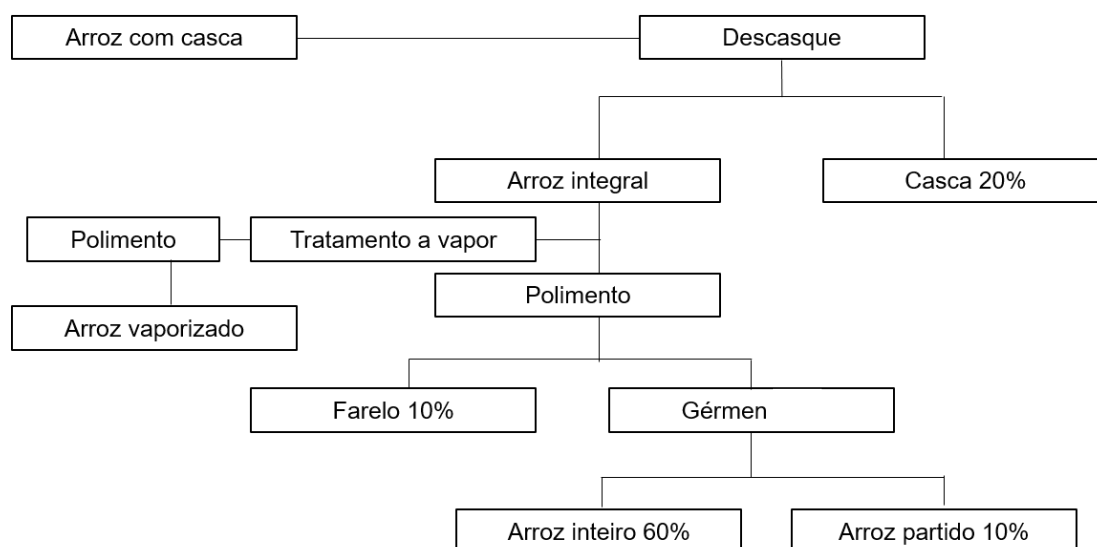


Figura 1.4 Fluxograma da produção do arroz (Fonte: adaptado de Smith e Dilday, 2003).

Durante o processo de polimento do arroz, produzem-se grandes quantidades de grãos partidos, o que se pode traduzir numa tentativa de aproveitamento dos mesmos através da produção da farinha de arroz. Assim, este subproduto pode ter interesse na substituição parcial ou total da farinha de trigo para desenvolver novos produtos, acrescentando valor ao subproduto e ao produto resultante (Carrilho, 2014).

1.3.2 Açúcar

Segundo a Portaria nº 762/79, açúcar é todo o edulcorante natural, extraído, em geral da cana ou da beterraba sacarina e constituído por sacarose, essencialmente.

O açúcar granulado é definido como açúcar refinado cristalizado e duro. Este obtém-se através da purificação do açúcar em rama, recristalizando a sacarose, a baixa pressão absoluta, filtrando e descorando-o. De seguida, os cristais de sacarose obtidos são separados e lavados em centrifugadoras e secos posteriormente. Assim, o açúcar é constituído por cristais de sacarose com elevado grau de pureza (Portugal. Portaria nº 762, 1979).

1.3.3 Água

A água é um componente essencial em quase todos os alimentos, pois além de nos hidratar, também possui um papel importante na manutenção do tempo de vida dos alimentos. A atividade da água (a_w) pode influenciar a velocidade de deterioração dos alimentos, em particular dos produtos de panificação, tanto através da perda das propriedades reológicas, como através da proliferação microbiana. Alimentos com baixo a_w têm um tempo de vida prolongado devido a sofrerem menos deteriorações pelos microrganismos. A água funciona como um plastificante nos alimentos e ajuda a explicar a formação da estrutura dos produtos e a variação das características sensoriais durante o seu armazenamento. Depois de misturar

os ingredientes durante a preparação dos produtos de panificação, a água presente na formulação é obrigada a redistribuir-se pelos diferentes componentes e, posteriormente, na cozedura. Estas alterações e a disponibilidade para outras reações físicas, químicas e bioquímicas contribuem para a formação da estrutura destes produtos, bem como para a sua palatibilidade. É de notar que a qualidade da água é bastante importante, tendo em atenção a dureza da água, evitando repulsões eletrostáticas (Cauvain e Young, 2008).

1.3.4 Fermento químico

O fermento químico é um agente levedante que leva à produção de CO₂, aumentando o volume e a leveza das bolachas durante a cozedura. Alguns fermentos podem conter misturas de bicarbonato de sódio, pirofosfato ácido de sódio ou fosfato monocalcico. Mas o componente químico mais utilizado é o bicarbonato de sódio. Devido à quantidade de fermento químico utilizado ser baixa, o único resíduo é o de fosfato de sódio, que não é significativo na estrutura final do produto (Glabe *et al.*, 1984; Carrilho, 2014).

1.3.5 Lecitina de soja

A lecitina de soja é o nome genérico para a mistura complexa de fosfolípidos insolúveis em acetona, composta por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolina, fosfatidilinositol e ácido fosfatídico, combinados com outras substâncias como triacilgliceróis. A lecitina está presente nos ovos, mas comercialmente é produzida a partir de grãos de soja. Forma uma emulsão com a água em certas concentrações, por isso serve como agente emulsionante e tensioativo em margarinas, maioneses, massas e recheios. Além disso, a lecitina de soja atua como antioxidante, retardando a deterioração de óleos e gorduras. Estabelece ligações químicas com grupos de átomos que contêm oxigénio ativo, bloqueando o processo de oxidação (Ivers, 1985; Carrilho, 2014).

1.3.6 Óleo vegetal

O óleo alimentar é constituído pela mistura de 2 ou mais óleos, refinados isoladamente ou em conjunto, com exceção do azeite (Freire, 2002).

Quimicamente um óleo é composto por duas frações: uma fração saponificável que representa cerca de 99 % de um óleo, insolúvel em água, constituída essencialmente por triglicéridos, mas também por mono e diglicéridos resultantes da hidrólise dos primeiros. Contém ainda ácidos gordos livres, fosfatídeos, glucósidos e pigmentos verdes e estes contêm clorofila e produtos resultantes da sua decomposição; uma fração insaponificável que representa entre 0,5 e 1,5 % de um óleo, solúvel em água, responsável pelo valor biológico, nutricional e pela resistência à oxidação, constituída por componentes menores, entre eles hidrocarbonetos, esteróis, ceras, álcoois, substâncias corantes e aromáticas, vitaminas, tocoferóis e polifenóis. A concentração da fração insaponificável depende do tipo de óleo, no

entanto, esta fração é sempre maior no óleo bruto do que no refinado, independentemente do tipo de óleo e assim diminui com o processamento (Machado, 2011).

Os triacilgliceróis são compostos em que cada grupo hidroxilo do glicerol é esterificado com uma molécula de um ácido gordo. O tipo e a posição de ácidos gordos presentes no triglicérido influencia as propriedades físicas, químicas e biológicas dos óleos. Entre os ácidos gordos presentes em óleos vegetais destacam-se o ácido oleico (C18:1) como ácido gordo monoinsaturado e o ácido linoleico (C18:2) como polinsaturado (Machado, 2011; Carrilho, 2014).

1.3.7 Margarina

Segundo a portaria nº 947/1998, margarina é um produto obtido a partir de gorduras e óleos vegetais e/ou animais, com teor de matérias gordas mínimo de 80% e máximo de 90%, com consistências variáveis de acordo com o fim que se pretende.

A margarina deve obedecer às características gerais descritas na Tabela 2, segundo Portugal (1998).

Tabela 2. Características da margarina (Fonte: Portugal, 1998).

Características	Limites
Organoléticas: Aspeto Cor Cheiro Sabor	Homogéneo e butiroso Branca ou amarela Butiroso ou inodoro (extinto) Butiroso ou insípido (extinto)
Água	Máximo 16%
Matéria gorda	Mínimo 80%
Pesquisa de microrganismos patogénicos	Negativo
Pesquisa de bactérias coliformes	Negativa em 1 g
Insaponificáveis	Máximo 1,5% (na matéria gorda)
Índice de acidez	Máximo 1,3% (na matéria gorda)
Índice de peróxidos	Máximo 10 (expresso miliequivalentes de oxigénio ativo por quilograma de matéria gorda)

1.4 Alimentos funcionais

Os alimentos funcionais podem apresentar efeitos benéficos para a saúde e/ou reduzir o riscos de incidência de doenças crónicas, para além da sua função nutricional básica (Martins *et al.*, 2004). Um alimento é considerado "funcional" se for devidamente demonstrado estes efeitos, melhorando a saúde e o bem-estar ou reduzindo o risco de algumas doenças.

O efeito destes alimentos provém de um ou mais ingredientes funcionais presentes na sua composição (Martins *et al.*, 2004).

O mercado dos alimentos funcionais está a crescer rapidamente e abrange diversos tipos de alimentos, tais como leite e produtos lácteos, cereais, bolachas, cremes para barrar, bebidas, entre outros. As alegações nutricionais e de saúde são importantes na rotulagem deste tipo de alimentos (Martins *et al.*, 2004).

Para que sejam considerados alimentos funcionais, os produtos devem ter alegações de saúde comprovadas pelas entidades nacionais competentes (por exemplo, nos Estados Unidos da América compete à *Food and Drug Administration* – FDA), as quais são suportadas por dados científicos e pela concordância generalizada dos investigadores das áreas de alimentação e nutrição.

Com o objetivo de harmonizar as diferentes legislações nacionais sobre as alegações nutricionais e de saúde, no sentido de proteger o consumidor ao fornecer mais informação, para além da informação prevista na legislação da União Europeia (UE), a Comissão Europeia (CE) adotou, em 16 de Julho de 2003, uma proposta de regulamento que regula a utilização destas alegações. Esta proposta surge em Dezembro de 2006 com o Regulamento da CE nº 1924/2006. Desta forma, apenas serão aceites as alegações de saúde que possam ser cientificamente comprovadas após avaliação pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar, devendo apresentar, na rotulagem, informação rigorosa sobre as informações de saúde comprovadas. (EFSA).

As microalgas são uma das fontes mais promissoras de compostos naturais tais como pigmentos, ácidos gordos, vitaminas, proteínas e polissacáridos, que podem ser utilizados como ingredientes funcionais nos mais variados alimentos (Batista, 2012).

1.5 Microalgas

As microalgas são uma vasta fonte biológica, representando uma das fontes mais promissoras para novos produtos e diversas aplicações. Estas podem ser usadas para aumentar o valor nutricional dos alimentos ou alimentação animal, devido à sua composição química equilibrada (hidratos de carbono, proteínas, lípidos e vitaminas tais como vitamina A, B₁, B₂, B₆, C e E). As microalgas são fonte de moléculas bastante interessantes como PUFA's, pigmentos, antioxidantes, compostos bioativos, com diversas aplicações na alimentação, nutrição, cosmética, farmacêutica e até mesmo indústrias de combustíveis (Batista, 2012).

Estes microrganismos unicelulares fotossintéticos podem ser encontrados na água e em todos os tipos de solo, incluindo os solos áridos com condições extremas. As microalgas são classificadas de acordo com a sua cor: classe *chlorophyceae* - algas verdes, classe

rhodophyceae - algas vermelhas, classe *cyanophyceae* - algas azuis e classe *phaeophyceae* - algas castanhas. Nos sistemas aquáticos, constituem a base da cadeia alimentar, formando o fitoplâncton (Gouveia *et al.*, 2008a).

A biotecnologia das microalgas é semelhante à agricultura convencional. No entanto, são consideradas uma das culturas do futuro, pois apresentam uma eficiência fotossintética 10 vezes superior às plantas superiores. Podem ser cultivadas em terras aráveis e não são sazonais, não competindo assim com outras culturas alimentares. Funcionam como captadoras de CO₂, contribuindo para a diminuição do efeito de estufa, aquecimento global e alterações climáticas. Crescem em água doce, salgada, salobra ou até mesmo em efluentes e águas residuais, podendo funcionar como tratamento destes (Gouveia *et al.*, 2008). Além disso, a composição química das microalgas pode ser alterada ao mudar as condições de cultivo (meio, luz, temperatura, salinidade, pH, CO₂) e ao submetê-las a condições de *stress*, leva a que estes microrganismos produzam maiores concentrações de compostos bioativos de interesse comercial. As microalgas apresentam uma taxa de crescimento elevado, duplicando a sua biomassa num período de 2 a 5 dias, atingindo altos rendimentos, sem a utilização de pesticidas, herbicidas ou fungicidas (Vaz *et al.*, 2016).

Quanto ao tipo de estrutura celular, as microalgas podem ser procarióticas ou eucarióticas. As microalgas eucarióticas mais importantes em termos de abundância são as diatomáceas (*Bacillariophyceae*), as algas verdes (*Chlorophyceae*) e as algas douradas (*Chrysophyceae*). Todas estas microalgas distinguem-se das procarióticas, por possuírem um núcleo e organelos separados para realizar a fotossíntese (cloroplastos) e para realizarem a respiração (mitocôndrias). As cianobactérias (*Cyanophyceae* ou algas verde-azuladas) (ex.: *Spirulina (Arthrospira) platensis* e *A. maxima*) são chamadas de microalgas, mas pertencem à *eubacteria* e são procarióticas, pois não têm um núcleo organizado. Existem mais de 20 000 espécies diferentes de microalgas e cianobactérias no ambiente marinho e de água doce (Challenges and Prospects Wang, 2013; Enzing *et al.*, 2014).

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) mais comuns nas microalgas são o ácido araquidónico (AA), o ácido linoleico (GLA) e o ácido eicosapentanóico (EPA). Os ácidos gordos nas microalgas correspondem à maior parte da fração lipídica e em certos casos, os PUFAs compõem 25 a 60% dos lípidos totais (Vaz *et al.*, 2016).

As microalgas ao serem expostas a elevados níveis de *stress* de oxigénio e radicais, desenvolvem mecanismos protetores contra as espécies reativas de oxigénio e radicais livres. Estes mecanismos traduzem-se em antioxidantes que dependem naturalmente da espécie de microalga e das condições de cultivo (Raymundo *et al.*, 2011).

Para a presente tese, foi utilizada a cianobactéria *Spirulina (Arthrospira) platensis*, pelo que a microalga será aprofundada no ponto 1.5.5.

1.5.1 Cultivo das microalgas

As microalgas podem ser cultivadas em água doce, salobra, salgada ou em águas residuais e possuem um grande rendimento na sua produção. Para o crescimento das microalgas é necessário água, luz solar, CO₂ e alguns fertilizantes (Challenges and Prospects Wang, 2013; Draaisma *et al.*, 2013).

O cultivo de microalgas pode ser autotrófico, fotoautotrófico ou heterotrófico. O cultivo autotrófico é aquele que produz compostos orgânicos complexos como hidratos de carbono, lípidos e proteínas através de substâncias presentes no meio em que se encontra. Seres autotróficos podem ser fotoautotróficos ou quimiotróficos, dependendo se utilizam a luz solar (fotossíntese) ou fontes orgânicas ou inorgânicas (quimiossíntese). Um organismo heterotrófico é aquele que não consegue fixar carbono e portanto precisa de uma fonte de carbono orgânica para o seu crescimento. Existe uma enorme variedade de sistemas de cultivo que podem ser abertos (*indoors*) ou fechados (*outdoors*). Estes sistemas variam entre lagoas de cultivo ao ar livre (*Figura 1.5*) e fotobioreatores fechados (*Figura 1.6*). Os sistemas mais utilizados em larga escala e a nível comercial são os sistemas abertos (Enzing *et al.*, 2014).



Figura 1.5 Pequena lagoa a céu aberto para cultivo de *Spirulina*, Ásia (Fonte: Enzing *et al.*, 2014).



Figura 1.6 Reator tubular horizontal na unidade de investigação do AlgaePARC da Wageningen UR NL (Fonte: Wageningen University & Research, 2017).

O tipo de sistema aberto mais utilizado é o de lagoas. Estas normalmente não ultrapassam os 30 cm de profundidade, de forma a permitir que a luz solar chegue a todas as células. A circulação da água com os nutrientes e as microalgas é feita por agitação mecânica em movimentos circulares em lagoas circulares ou mais comumente por pás giratórias em lagoas do tipo *Raceway*. Estes sistemas apresentam baixo custo de construção, têm fácil manutenção e a energia necessária é bastante reduzida. No entanto, neste tipo de sistema não é possível controlar a temperatura e também é bastante suscetível à invasão por algas predadoras, algas parasitas ou outras estirpes que se adaptem bem às condições do meio. Só algumas espécies conseguem crescer neste tipo de sistemas ao aplicar um meio seletivo (ex.: salinidade para *Dunaliella* ou alto pH para *Spirulina (Arthrospira) platensis*) ou produzindo grandes quantidades de inóculo a condições controladas rigorosamente e tirando partido de espécies que crescem rapidamente, como o caso da *Chlorella*. Além disso, a concentração de biomassa e a produtividade volumétrica são muito baixas, devido à extensa área e baixa agitação que impede a homogeneização do meio e correta difusão do CO₂ (Enzing *et al.*, 2014).

Existem vários tipos de sistemas fechados (ex.: tanques de fermentação, fotobioreatores, fotobioreatores tubulares, fotobioreatores em painéis, etc.), sendo que os fotobioreatores (FBRs) tubulares são os mais utilizados, pois adequam-se facilmente ao interior (estufas) ou ao exterior. Apesar de os custos de instalação, operação e manutenção serem naturalmente superiores aos custos dos sistemas abertos, os sistemas fechados apresentam algumas vantagens (Challenges and Prospects Wang, 2013; Enzing *et al.*, 2014):

- ✓ Previnem ou minimizam a contaminação.

- ✓ Têm maior controlo das condições de cultivo (pH, CO₂, O₂, temperatura, nutrientes, etc.).
- ✓ Previnem a evaporação e reduzem a utilização de água.
- ✓ Têm menor perda de CO₂ à saída do reator.
- ✓ Atingem maior concentração de biomassa e consequentemente têm uma maior produtividade volumétrica.

Os fotobioreatores tubulares podem ser dispostos na vertical, na horizontal, em alfa ou helicoidais e são constituídos por tubos transparentes de plástico (acrílico), sacos de polietileno de baixa densidade ou de vidro e normalmente não ultrapassam os 10 cm de diâmetro (Guimarães, 2012; Challenges and Prospects Wang, 2013). As condições de cultivo das microalgas podem variar dependendo das condições naturais da microalga em específico. Os maiores desafios para o seu cultivo para alimentação humana são a redução dos custos de produção, o melhoramento das tecnologias de produção para a segurança dos produtos alimentares e a estabilidade das culturas em larga escala, evitando contaminações e perda das culturas (Enzing *et al.*, 2014). Na Universidade de Florença e sua empresa spin-off Fotosintética & Microbiológica s.r.l., o grupo liderado pelo Professor Mário Tredici, desenvolveu um tipo de fotobioreator planar com o nome de Green Wall Panel (GWP®) composto por mangas de polietileno num suporte metálico. Este suporte tem capacidade de se inclinar e girar ao longo do dia de forma a maximizar a captação de luz solar e consequentemente otimizar a capacidade fotossintética e produtividade de biomassa (Figura



Figura 1.7 Fotobioreator tubular em painel (Fonte: <https://acuiculturamarina.com/2015/02/11/piensos-animales-con-algas/>).

1.7)

1.5.2 Perspetivas sobre o mercado das microalgas

Apesar do total de produção em volume do mercado das microalgas em geral continue relativamente baixo, tem-se observado um elevado crescimento desde 1999. A produção de microalgas passou de 1000 toneladas em 1999 para 5000 toneladas de matéria seca em 2004, representando 1 bilhão de euros. Em 2011, a produção em volume subiu para 9000 toneladas de matéria seca. Neste ano, o valor do mercado global de biotecnologia marinha, tendo como maior componente as microalgas, foi estimado em 2,4 bilhões de euros. É esperada uma taxa de crescimento de 10% ao ano (Enzing *et al.*, 2014).

1.5.3 Aplicações das microalgas

Tradicionalmente, microalgas como a *Spirulina* e a *Chlorella* eram diretamente vendidas como suplemento alimentar, sem nenhum tipo de processamento a não ser a secagem. No entanto, hoje em dia, a biotecnologia das microalgas tem aplicações comerciais em diferentes áreas, como a alimentação, energia, farmacêutica e cosmética (Enzing *et al.*, 2014).

A comercialização em larga escala das microalgas começou no Japão nos anos 60, com o cultivo da *Chlorella* como aditivo alimentar, expandindo-se nos anos 70 e 80 pelo mundo, em países como a Índia, EUA, Israel e Austrália (Batista, 2012).

Segundo Enzing *et al.* (2014), as microalgas apresentam inúmeras aplicações na indústria alimentar na extração de pigmentos (e.g. ficocianina, β -caroteno e astaxantina), nutracêuticos (e.g. EPA e DHA), antioxidantes, entre outros. As microalgas também podem ser utilizadas para a incorporação em bolachas (Gouveia *et al.*, 2007; 2008b), *noodles* e outros produtos alimentares (Enzing *et al.*, 2014).

Ainda assim, existe uma enorme margem de crescimento para o mercado das microalgas neste setor, no desenvolvimento de massas, biscoitos, pão, *snacks*, chocolates, gomas, iogurtes, bebidas, etc., tanto como suplemento nutricional ou como corante natural. As espécies de microalgas mais utilizadas para extração de β -caroteno são a *Spirulina*, *Chlorella* e *Dunaliella salina* e para obtenção de astaxantina é a *Haematococcus pluvialis* (Batista, 2012).

Além da utilização na alimentação humana, as microalgas também são usadas na alimentação animal e aquacultura, sendo cerca de 30% da produção mundial de microalgas vendida para este fim (Challenges and Prospects Wang, 2013). Na indústria da cosmética, algumas empresas como a Dutch chemical company DSM têm apostado no desenvolvimento e comercialização de produtos faciais e de cuidados de pele através de extratos de microalgas, com eficácia comprovada.

No setor da energia, diversas microalgas como a *Chlorella*, *Nannochloropsis* e *Nitzschia* podem ser usadas para produção de biodiesel, pois possuem uma estrutura simples, elevada taxa de crescimento, alto teor de lípidos na sua constituição (maior produtividade relativamente às culturas tradicionais), são mais sustentáveis e não competem com outras culturas. O teor lipídico das microalgas pode variar entre 16 e 68% do seu peso seco, sendo que pode ser mais elevado ao manipular as condições de cultivo, podendo mesmo chegar até 70% do seu peso seco na ausência de azoto. Para que a produção de biodiesel a partir de microalgas seja sustentável ainda há margem para melhorar a produtividade, bem como a diminuição dos custos do processo (Wang, 2013).

Apesar de todo o potencial das microalgas, a sua exploração biotecnológica para alimentação humana é bastante restrita a poucas espécies, devido à regulamentação de segurança alimentar ser exigente, a fatores comerciais e à procura do mercado. Os consumidores podem ter à partida alguma relutância em adquirir estes novos produtos, devido a fatores étnicos conservadores, aspetos religiosos ou socioculturais, embora estes alimentos suplementados com microalgas possam ser sensorialmente mais atrativos, devido à sua cor, aliada aos benefícios para a saúde (Batista, 2012).

1.5.4 Compostos bioativos presentes nas microalgas

As microalgas são sem dúvida uma fonte promissora de compostos de alto valor biológico tais como ácidos gordos polinsaturados, pigmentos como clorofilas, carotenóides e ficobiliproteínas, polissacáridos, proteínas, entre outros. Como anteriormente referido, quando são submetidas a alterações no meio de cultivo, tais como a presença ou ausência de certos nutrientes, intensidade da luz, pH, temperatura e salinidade, as microalgas são estimuladas a biossintetizar uma grande variedade de compostos, alguns deles com elevado interesse comercial. Assim sendo, as microalgas funcionam como bioreatores naturais capazes de crescer, produzir e acumular compostos bioativos mesmo sob condições de *stress* (Batista, 2012).

1.5.4.1 Pigmentos

A característica mais atrativa do ponto de vista sensorial nas microalgas é a cor. Estas são consideradas os principais fotosintetizadores existentes na terra, produzindo pigmentos como as clorofilas a, b e c, carotenóides e ficobiliproteínas. O teor destes compostos depende do tipo de microalga e das condições de cultivo e tornam-nas mais eficientes na utilização da luz solar, protegendo-as contra a radiação solar. No entanto, o seu teor pode ser afetado por fatores como a temperatura, pH, salinidade, luz, limitação de nutrientes, pesticidas e metais pesados. Além da função como antioxidante, também possui a função de corante natural,

podendo substituir a utilização dos corantes sintéticos na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética (Batista, 2012).

Clorofilas

Todas as microalgas possuem um ou mais tipos de clorofilas. A clorofila-a, pigmento fotossintético primário, encontra-se presente em todas as algas, sendo o único tipo existente nas cianobactérias e nas rodófitas. A clorofila -b está presente nas clorófitas e euglenófitas e as clorofilas -c, -d e -e são encontradas em algumas algas marinhas e em diatomáceas. A quantidade de clorofilas presente nas microalgas varia entre 0,5 e 1,5% de peso seco (Gouveia *et al.*, 2008a; Batista, 2012). Alguns derivados destes compostos apresentam benefícios para a saúde, como atividade antioxidante, antimutagénica e anticarcinogénica (Dewapriya e Kim, 2014).

Carotenóides

As microalgas contêm carotenóides que podem ser amarelos, laranjas ou vermelhos. Estes compostos podem ser de dois tipos os carotenos e as xantofilas e são responsáveis pela cor dos frutos, vegetais e outras plantas. Existem 700 tipos de carotenóides conhecidos, embora os com maior relevância sejam o β -caroteno e a astaxantina (pertencente às xantofilas) (Dewapriya e Kim, 2014). Nas microalgas, os carotenóides têm como função proteger contra a luz solar, ajudam no fototropismo e na fototaxia. A concentração média destes pigmentos, na maioria das algas, varia entre 0,1 e 2%, havendo microalgas que sob condições de *stress* conseguem produzir até 14% de β -caroteno. Os carotenóides são utilizados na indústria alimentar como corantes naturais, na alimentação animal como aditivos e na indústria cosmética em cuidados de pele. Apresentam inúmeros benefícios nutricionais e terapêuticos, devido à sua capacidade de atuar como pró-vitamina A, sendo convertidos em vitamina, às suas propriedades antioxidantes que permitem captar os radicais livres e prevenir contra certas doenças degenerativas, como arteriosclerose, doenças cardiovasculares, cataratas e alguns tipos de cancro (Gouveia *et al.*, 2008b).

Ficobiliproteínas

As ficobiliproteínas são constituídas por uma cadeia principal de proteína ligada a grupos tetrapirrol cromofóricos prostéticos. Estes são pigmentos fotossintéticos bastante coloridos, fluorescentes e solúveis em água, que se encontram em algumas microalgas tais como cianobactérias, rodófitas e criptófitas. Existem dois tipos de ficobiliproteína, a ficocianina presente na *Spirulina* (*Arthrospira*) e a ficoeritrina presente na rodófito *Porphyridium*. A ficocianina é um pigmento azul muito utilizado como corante natural na indústria alimentar (pastilhas, gelados e geleias), na cosmética (batons, eyeliners e sombras de olhos) e para

investigação biomédica (marcadores fluorescentes). Além, das suas propriedades antioxidantes, a ficocianina tem demonstrado propriedades anti-inflamatórias, anticancerígenas, neuroprotetoras e hepatoprotetoras (Gouveia *et al.*, 2008b).

1.5.4.2 Ácidos gordos polinsaturados

Os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) são lípidos essenciais ao bom funcionamento do nosso organismo, mais precisamente cérebro e acuidade da visão infantil, sendo que os PUFA de maior interesse são o ácido linolénico (GLA, 18:3 ω 6), o ácido araquidónico (AA, 20:4 ω 6), o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5 ω 3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6 ω 3) (Gouveia *et al.*, 2008a). Como não conseguimos sintetizar estes ácidos gordos polinsaturados, temos de os ir buscar à alimentação e a importância, em particular, do DHA e do EPA para a saúde foi reconhecida, em 2004, pela *Food and Drug Administration*, sendo vendidos como suplementos alimentares nutracêuticos. A fonte de PUFAs mais convencional são os peixes e os óleos de peixe, no entanto cada vez opta-se por outras alternativas, devido ao perigo de contaminação por metais e pesados e o cheiro intenso característico. Os peixes alimentam-se de algumas microalgas marinhas que sintetizam e acumulam estes compostos, sendo uma fonte rica em PUFAs com teor de 10-20% da biomassa total. As melhores espécies produtoras de EPA são *Nannochloropsis spp.*, *Porphyridium cruentum*, *Phaeodactylum tricornutum* e *Chaetoceros calcitrans* e as melhores espécies produtoras de DHA são *Isochrysis galbana* e *Cryptocodinium spp.* (Dewapriya e Kim, 2014).

1.5.4.3 Proteínas

Diversas espécies de microalgas têm-se revelado uma importante fonte alternativa de proteína, algo que é cada vez mais emergente, devido à previsão de insuficiente proteína animal para o aumento da população no futuro (Batista, 2012). O conteúdo proteico de algumas microalgas como *Chlorella*, *Spirulina*, *Scenedesmus*, *Dunaliella*, *Micractinium*, *Oscillatoria*, *Chlamydomonas* e *Euglena* chega a mais de 50% do seu peso seco e, além disso estas proteínas apresentam alto valor biológico, pois são constituídas por aminoácidos essenciais como a lisina, leucina, isoleucina e valina. No caso, da *Spirulina* e da *Chlorella*, o seu valor biológico proteico é de 77.6% e 71,6%, respetivamente, o que para além disso também possuem proteínas bioativas (Dewapriya e Kim, 2014). Alguns estudos indicam que o subproduto da indústria de biofuel produzido através de microalgas pode ser usado como uma fonte barata de proteínas bioativas (Dewapriya e Kim, 2014).

1.5.4.4 Polissacáridos

Os polissacáridos microbianos dividem-se essencialmente em três grupos: dependendo da sua localização na célula: polissacáridos constituintes da parede celular, polissacáridos de reserva e polissacáridos extracelulares ou exopolissacáridos (EPS) (Dewapriya e Kim, 2014). A celulose é o constituinte da parede celular das algas eucarióticas, enquanto as cianobactérias como a *Spirulina* possuem outro polissacárido na sua parede, o peptidoglucano, tornando a sua biomassa com maior digestibilidade. O amido e o β -1,3-glucano são as substâncias de reserva mais comuns nas microalgas, estando presentes em concentrações até 50% (Batista, 2012). *Porphyridium cruentum*, uma das algas mais promissoras para fins comerciais, produz EPS sulfatado que pode substituir a carragenina em inúmeras aplicações. Apresenta relevante atividade biológica, dado o seu poder antirretroviral, anti-inflamatório, hipocolesterolémico e inibidor da atividade de proliferação de células tumorais (Gouveia *et al.*, 2008b).

1.5.4.5 Vitaminas e minerais

As microalgas são uma excelente fonte de vitaminas essenciais com propriedades antioxidantes, tais como vitamina A, vitamina C, tiamina (B1), riboflavina (B2), ácido pantoténico (B5), piridoxina (B6), biotina (B7), ácido fólico (B9), vitamina B12, vitamina C e vitamina E (Vaz *et al.*, 2016). São também uma valiosa fonte de minerais, tais como Sódio (Na), Potássio (K), Cálcio (Ca), Magnésio (Mg), Ferro (Fe) e Zinco (Zn) (Batista, 2012). Os elevados teores de vitamina B₁₂ e Ferro em algumas microalgas, como a *Spirulina*, revelam-se bastante adequados como suplementos nutricionais para a dieta vegetariana (Gouveia *et al.*, 2008a). O teor vitamínico das microalgas depende do genótipo e das condições de cultivo, no entanto este pode variar com fatores ambientais, a colheita e o método de secagem (Batista, 2012).

1.5.5 *Arthrospira* (*Spirulina*)

A *Spirulina* (*Arthrospira*) (Figura 1.8) é usada como alimento desde os tempos ancestrais primeiramente no México, tendo se estendido posteriormente a África, Hawaii, Califórnia, China, Taiwan e Japão. No Chad (África) servia de alimento para os indígenas. Primeiro, era colhida no lago alcalino Kossorom e depois usada para preparar um bolo de nome *dihe* (Abdulqader, *et al.*, 2000). Atualmente a sua produção atinge a escala mundial e tem sido usada como ingrediente funcional, como suplemento ou corante, em variados produtos alimentares para aumentar a qualidade nutricional como ação terapêutica para doenças crónicas, ou ainda em cosméticos (Becker, 2004).

A *Arthrospira platensis*, comumente conhecida como *Spirulina*, é uma cianobactéria filamentosa (procariótica) que pertence à classe Oscillatoriaceae. É considerada como uma microalga verde azulada devido ao seu teor em clorofila e à sua capacidade para fazer fotossíntese (fotoautotrófica). Devido a problemas de confusão na classificação taxonômica, as espécies pertencentes ao género *Arthrospira* foram classificadas como pertencentes ao género *Spirulina*. Só mais recentemente, recorrendo a técnicas avançadas de sequenciação genética se clarificou este assunto (Sili, C.; Giuseppe, T.; Vonshak, 2012). No entanto, sendo esta espécie tão conhecida, optou-se por continuar a designar a *Arthrospira platensis* como *Spirulina*, em termos comerciais. Neste trabalho optou-se também por manter esta designação.



Figura 1.8 *Arthrospira* (*Spirulina*).

É estimada uma produção anual mundial de 3000 toneladas por ano de *Spirulina*, sendo utilizado como ingrediente ou como suplemento alimentar, devido ao seu elevado conteúdo proteico, assim como um alto teor em ácido γ -linolénico (GLA;18:3 ω 6) e de vitamina B₁₂. As cianobactérias têm uma grande capacidade para armazenar nutrientes, como por exemplo o fosfato e cianoficina (Becker, 2004).

O conteúdo proteico da *Spirulina* pode variar entre 50 e 70% da sua massa seca e contém todos os aminoácidos essenciais, em particular a leucina, valina e isoleucina, apresentando uma elevada digestibilidade (83 a 90%). As análises nutricionais e toxicológicas que têm sido efetuadas, têm demonstrado que a biomassa microalgal é benéfica para suplementos alimentares ou substituinte de fontes de proteína convencionais (Vaz *et al.*, 2016).

Segundo (Batista *et al.*, 2013), ao comparar o conteúdo proteico da *Spirulina maxima* com outras microalgas (*Chlorella vulgaris*, *Haematococcus pluvialis*, *Diatronema vikianum* e *Isochrysis galbana*), esta é a que apresenta maior teor proteico (44,9%), contra 10 a 12% da *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis*. No entanto, ao comparar o teor lipídico, a

Spirulina maxima é a que apresenta menor teor (4-5%), contra 40% da *Chlorella vulgaris* e *Haematococcus pluvialis*. É de notar que a *Spirulina* utilizada para este estudo possui valores de proteína bastante interessantes (68,9%), assim como de teor lípido (10,7%) (Tabela 3) (Niccolai, 2016; Batista *et al.*, 2017).

Além do seu interesse nutricional, a *Spirulina* possui múltiplos benefícios para a saúde, como o alívio da hiperlipidemia, supressão da hipertensão, proteção contra a insuficiência renal, promoção do crescimento de *Lactobacillus*, diminuição dos níveis de glucose no sangue, efeito anticarcinogénico e propriedades hipocolesterolémicas. Também foi reportada a inibição de alguns vírus patogénicos (ex. Herpes simplex virus, influenza A, HIV-1), devido à presença de um polissacárido sulfatado. A *Spirulina* também possui uma fonte natural de ficocianina, um pigmento azul valioso usado como corante natural na comida e nos cosméticos, também tendo potencialidades como marcador bioquímico em imunoensaios, eliminador de radicais livres e ainda possui potenciais efeitos terapêuticos (Batista, 2012).

Capítulo 2 – Materiais e métodos

2.1 Materiais

A microalga utilizada para incorporação nas bolachas foi a *Spirulina (Arthrospira) platensis* F&M-C256. A biomassa liofilizada desta microalga foi fornecida pela Universidade de Florença, Departamento de Produção Agro - Alimentar e Ciências Ambientais (DISPAA), de acordo com a parceria estabelecida com o ISA. A sua produção foi feita pela empresa Fotossintética & Microbiológica S.R.L. (Florença, Itália). A composição química da biomassa de microalgas foi fornecida pelo DISPAA-Universidade de Florença. A farinha de arroz utilizada na preparação das bolachas foi adquirida comercialmente e é da marca Ceifeira (Atlantic Meals). A composição química da microalga bem como da farinha de arroz encontra-se na Tabela 3.

Tabela 3. Composição química da farinha de arroz e da microalga utilizada na preparação das bolachas (% , m/m).

	Proteína (%)	Hidratos de carbono (%)	Lípidos (%)	Cinza (%)
<i>Spirulina (Arthrospira) platensis</i> F&M-C256*	68,9 ± 1,0	12,8 ± 0,2	10,7 ± 0,6	6,1 ± 0,1
Farinha de arroz Ceifeira (Atlantic Meals)**	7,6	78,5	0,7	< 0,1

* Dados fornecidos pelos colegas da Universidade de Florença (Niccolai, 2016)

** Dados fornecidos no rótulo da embalagem.

Os restantes ingredientes utilizados para a preparação das bolachas doces foram creme vegetal (59% de matéria gorda; Vaqueiro), açúcar branco de cana (Belbake), fermento químico em pó (amido de milho, difosfato sódico e bicarbonato de sódio; Pingo doce) e água destilada. Para a preparação das bolachas salgadas, utilizou-se óleo vegetal (Fula), sal refinado (Pingo doce), açúcar branco de cana (Belbake), fermento químico em pó (Pingo doce), cujos ingredientes são amido de milho e levedantes (difosfato dissódico e bicarbonato de sódio), lecitina de soja granulada (Santiveri) e água destilada. Todos estes ingredientes foram adquiridos comercialmente. Para facilitar a leitura a microalga *Spirulina (Arthrospira) platensis* F&M-C256 vai ser referida como *Spirulina*.

2.2 Métodos

2.2.1 Estudos da absorção de água e óleo da farinha de arroz

Foram realizadas análises preliminares de absorção de água e óleo à farinha de arroz utilizada, de modo a prever o impacto que a farinha de arroz terá na massa das bolachas.

A determinação da capacidade de absorção de água e da solubilidade foram feitas de acordo com o método desenvolvido por Leach *et al.*, 1959.

Este método envolve a suspensão de 0,5 g da amostra de farinha num volume de água conhecido (6 g), agitação a 20 °C, 50 °C, 70 °C e 90 °C durante 30 minutos e centrifugação a 10000 g durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sedimento resultante é pesado e calcula-se o índice de absorção de água. O sobrenadante é colocado a secar numa estufa a 105 °C durante 3 horas e calcula-se a solubilidade da amostra. As determinações foram realizadas em triplicado. O Swelling power (SP) é calculado através da equação 1.

$$SP \text{ (g/g)} = \frac{m_1}{m - m_2} \quad (1)$$

O índice de absorção de água (IAA) ou water absorption index (WAI) é calculado através da equação 2.

$$IAA \text{ (g/g)} \text{ ou } WAI \text{ (g/g)} = \frac{m_1}{m} \quad (2)$$

A solubilidade (S) ou Solubility é calculado através da equação 3.

$$S \text{ (\%)} = \frac{m_2}{m} \times 100 \quad (3)$$

O Water binding capacity (WBC) é calculado através da equação 4.

$$WBC \text{ (g/g)} = \frac{m_1 - m}{m} \quad (4)$$

Onde m_1 é a massa do sedimento (g), m_2 é a massa do resíduo após evaporação na estufa (g) e m é a massa da amostra inicial (g).

A determinação da capacidade de absorção de óleo foi feita de acordo com o método desenvolvido por Kaushal, 2012. Este método, tal como o anterior, envolve a suspensão de 0,5 g da amostra de farinha em 6 g de óleo, agitação a 20 °C durante 1 hora e centrifugação a 10000 g durante 35 minutos. De seguida, retira-se o óleo sobrenadante com uma pipeta dos tubos que contêm a amostra e invertem-se os tubos para deixar escorrer o óleo totalmente

durante 25 minutos. As determinações foram realizadas em triplicado. O índice de absorção de óleo (IAO) ou oil absorption capacity (OAC) é calculada através da equação 5.

$$\text{IAO ou OAC (g/g)} = \frac{m_1}{m} \quad (5)$$

O oil binding capacity é calculado através da equação 6.

$$\text{OBC (g/g)} = \frac{m_1 - m}{m} \quad (6)$$

Onde m_1 é a massa do resíduo (g) e m é a massa da amostra (g).

2.2.2 Preparação das bolachas

Para a preparação das bolachas doces, utilizaram-se *batches* de 150 g de massa. Primeiro procedeu-se à mistura de todos os ingredientes previamente pesados na balança Precisa BJ 1100D. Estes são misturados e amassados num robô de cozinha (bimby, Vorwerk) durante 60 s na velocidade 4. De seguida, procedeu-se à moldagem da massa com o auxílio de réguas em acrílico de 4 mm de espessura e do rolo da massa. Para criar a forma pretendida das bolachas, recorre-se a uma forma circular de 48 mm de diâmetro. A massa já moldada é colocada num tabuleiro para ir ao forno ventilado Arianna-Unox a temperatura controlada (110°C) durante 40 minutos. Posteriormente, as bolachas são arrefecidas ao ar durante 30 minutos até atingir a temperatura ambiente, antes de serem guardadas num recipiente hermeticamente fechado para análises posteriores.

Para a preparação das bolachas salgadas (*Figura 2.1*), utilizaram-se igualmente *batches* de 150 g de massa. O procedimento é semelhante ao das bolachas doces exceto em alguns parâmetros. Os ingredientes são pesados, misturados e amassados no robô de cozinha (bimby, Vorwerk) durante 90 s na velocidade 4. De seguida, a massa é moldada com o auxílio de réguas em acrílico de 2 mm de espessura, do rolo da massa e de uma forma circular de 48 mm de diâmetro. Antes de irem ao forno, as bolachas são perfuradas com auxílio de um garfo para evitar que insuflam demasiado. Depois as bolachas vão ao forno ventilado Arianna-Unox num tabuleiro a temperatura controlada (180 °C) durante 10 minutos. Posteriormente, as bolachas são colocadas na câmara de secagem Arianna-Unox a 60°C durante 30 minutos e depois são guardadas num recipiente hermeticamente fechado para análises posteriores.

Tanto no caso das bolachas doces como nas salgadas, as análises físicas (dimensões, cor, textura) realizaram-se 24 horas depois da preparação das bolachas, sendo de seguida pulverizadas (moinho de café, Taurus), para medição de a_w e composição química

(conservação das amostras no congelador). Após o processo de moldagem foram retiradas amostras de massa para caracterização reológica e análise da cor antes da cozedura.

Na Tabela 4 são apresentadas as diferentes formulações de bolachas doces para as bolachas controlo, para as bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina* (F1, F2, F3 e F4, respetivamente) e devido a estas apresentarem elevada dureza estudaram-se também as concentrações de 38%, 40%, 42% e 44% de farinha de arroz e 2% de *Spirulina* (F5, F6, F7 e F8, respetivamente). Na Tabela 5 encontram-se as diferentes formulações de bolachas salgadas para as bolachas controlo e para as bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina* (F1, F2, F3 e F4, respetivamente). Todas as percentagens apresentadas nesta tese são expressas em massa/massa (m/m). As formulações foram baseadas em formulações otimizadas em trabalhos anteriores com farinha de trigo, doces (Batista *et al.*, 2017) e salgadas (Batista, *et al.*, submetido) com biomassa de microalgas, de forma a avaliar o efeito da farinha de arroz



Figura 2.1 Preparação das bolachas salgadas *Spirulina* 2%.

Tabela 4. Formulações de bolachas doces.

Ingredientes	Controlo	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)
Farinha de arroz	49	48	47	45	43	38	40	42	44
Açúcar	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Margarina	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Água destilada	10	10	10	10	10	19	17	15	13
Fermento em pó	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>Spirulina</i>	0	1	2	4	6	2	2	2	2

Tabela 5. Formulações de bolachas salgadas.

Ingredientes	Controlo	F1	F2	F3	F4
	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)	g/100g (%)
Farinha de arroz	89,25	87,75	86,25	83,25	80,25
Água	42,75	42,75	42,75	42,75	42,75
Óleo	11,25	11,25	11,25	11,25	11,25
Fermento em pó	2,25	2,25	2,25	2,25	2,25
Açúcar	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Sal	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Lecitina de soja	0,75	0,75	0,75	0,75	0,75
<i>Spirulina</i>	0	1	2	4	6

2.2.3 Caracterização física das bolachas

2.2.3.1. Dimensões

Para a medição das dimensões das bolachas, foi retirada uma amostra de 10 bolachas e foi medida a espessura e o diâmetro com o auxílio de um paquímetro digital (Leetools-684132). O *spread-ratio* é calculado através da equação 7.

$$\text{spread-ratio} = \frac{\text{diâmetro } (\varnothing)}{\text{espessura } (h)} \quad (7)$$

2.2.3.2. Cor (bolachas e massa)

A cor é um dos principais atributos sensoriais nos alimentos, pois constitui o primeiro impacto de aceitação ou rejeição de um produto, relacionando-se com a percepção de qualidade por parte do consumidor. Várias características físicas como o tamanho, textura, brilho, polarização e estado físico do alimento podem influenciar a cor (Santos e Faraoni, 2008). No caso das bolachas a cor é influenciada pela concentração de *Spirulina* e pelo binómio tempo-temperatura da cozedura.

Na determinação instrumental da cor utiliza-se um colorímetro que tem acoplado uma fonte de iluminação padrão, em que os resultados são dados a partir do sistema de coordenadas L^* , a^* e b^* ou CIELAB (Figura 2.4). Este sistema cromático é o mais utilizado nas indústrias, pois tem como base as propriedades físicas da luz e o funcionamento do olho humano. Neste sistema, a cor é localizada no espaço através de três coordenadas retangulares: L^* que mede a variação da luminosidade que varia entre 100% (branco) e 0% (preto) e a^* e b^* que medem a cromaticidade, variando entre a cor verde ($-a^*$) e a vermelha ($+a^*$) e entre a cor azul ($-b^*$) e a amarela ($+b^*$). Ainda existem as coordenadas cilíndricas, em que a coordenada h° (*Hue-Angle*) corresponde ao ângulo da tonalidade e a C^* (*Chroma*) que

define a saturação. O valor de saturação C^* representa a distância do eixo de luminosidade (L^*) e inicia-se em zero no centro. O ângulo de tonalidade começa no eixo $+a^*$ e movimenta-se em sentido anti-horário e expressa-se em graus CIE (Calvo e Salvador, 2000; Santos e Faraoni, 2008).

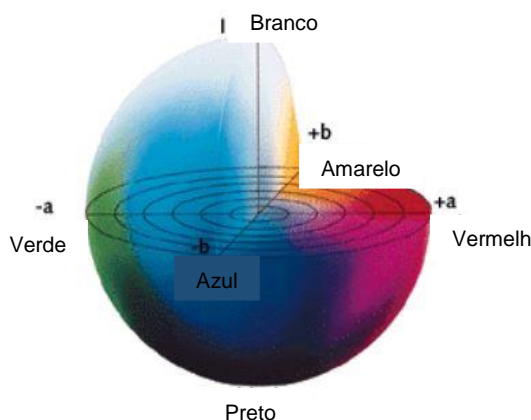


Figura 2.2 Sistema cromático CIELAB (Fonte: adaptado de www.linocolor.com).

O parâmetro de cor C^* (Chroma) que define a intensidade da cor foi calculado com base na equação 8.

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (8)$$

O parâmetro de cor h° (Hue-Angle) que mede a tonalidade foi calculado a partir da equação 9.

$$h^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (9)$$

A diferença de cor (ΔE^*) entre a massa crua das bolachas e as bolachas depois de cozidas foi calculada com base equação 10.

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (10)$$

A medição da cor das massas e das bolachas foi realizada diretamente sobre a superfície das mesmas, utilizando o colorímetro Minolta CR-400 (Japão) (Figura 2.5) com uma fonte de iluminação padrão D65 e um ângulo visual de 2° , calibrado através de um padrão branco ($L^* = 94.61$; $a^* = -0.53$; $b^* = 3.62$). Os resultados foram expressos de acordo com o sistema CIELAB e as medições foram realizadas à temperatura ambiente e sob luz artificial constante. Foram efetuadas 10 repetições de cada amostra para cada ensaio (bolachas doces e salgadas).



Figura 2.3 Colorímetro Minolta CR-400 (Japão).

2.2.3.3. Textura – *snap test* e penetração simples

A textura representa um papel importante na percepção de qualidade de um alimento pelo consumidor. Termos como “mole”, “duro”, “suave” ou “crocante” podem descrever a textura de um alimento que é fortemente influenciada pelas interações entre os macronutrientes do alimento como as proteínas, os hidratos de carbono e os lípidos. Os métodos instrumentais para medir as propriedades reológicas ou mecânicas podem ser utilizadas para estabelecer parâmetros relacionados com as características sensoriais de textura. Este atributo também atua na libertação do aroma da matriz do alimento nos recetores sensoriais. Esta libertação de *flavour* está intimamente relacionada com o ponto de rutura da estrutura do alimento causada pela mastigação (Day e Golding, 2016).

A avaliação da textura é realizada num texturómetro com células de carga de peso variável (5, 10, 15 kg) consoante o nível de sensibilidade pretendido. As cargas maiores oferecem menor sensibilidade, sendo utilizadas para materiais mais firmes. A textura das bolachas foi medida através da utilização do texturómetro TA-XT plus Stable Micro Systems, UK (a) com uma célula de carga de 5 kg. Realizaram-se testes de *bending* (*3 point bending test*), utilizando uma sonda retangular de aço inoxidável (HDP/BSG). A velocidade de teste foi definida para 3 mm/s e a distância percorrida pela sonda para 8 mm nas bolachas doces e para 5 mm nas bolachas salgadas. Dos texturogramas obtidos retirou-se a força máxima (N), correspondente à dureza das bolachas, a distância percorrida pela sonda, correspondente à fraturabilidade e a área sob a curva que corresponde ao trabalho de *bending* realizado pela sonda (N.s) (b). Também foram realizados testes de penetração, utilizando uma sonda cilíndrica de aço inoxidável com 2 mm de diâmetro. A velocidade de teste foi definida para 0,5 mm/s e a distância percorrida pela sonda para 6 mm. Dos texturogramas obtidos retirou-se a área sob a curva que corresponde ao trabalho de penetração realizado pela sonda, correspondente à dureza das bolachas, a força máxima (N) e a distância percorrida pela sonda, correspondente à fraturabilidade. As medições foram realizadas à temperatura

ambiente e sob luz constante. Foram efetuadas cerca de 10 repetições para cada amostra em cada teste.

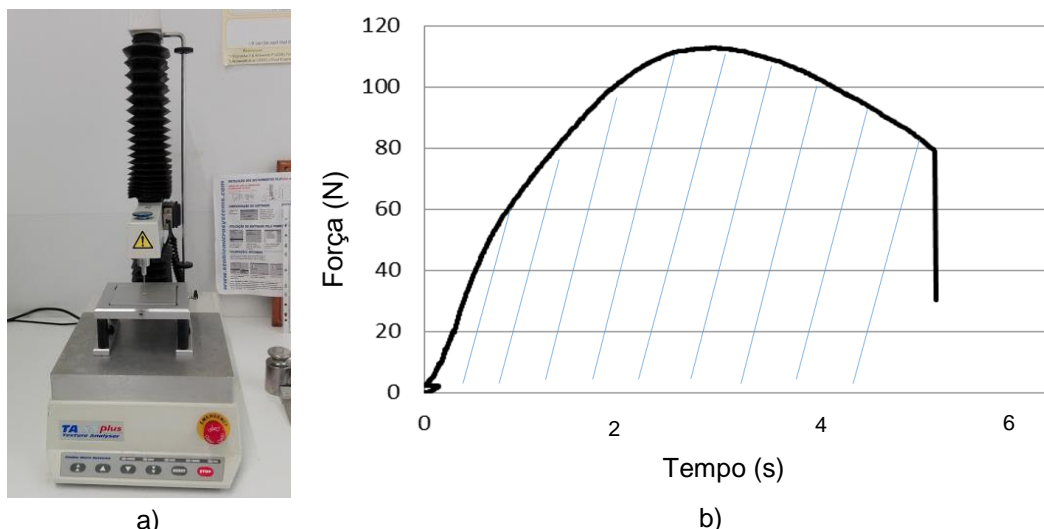


Figura 2.6 Texturómetro TA-XT plus (a) e texturograma típico do teste de *bending* (b).

2.2.3.4. Atividade da água e humidade

Para a determinação da atividade da água e humidade das bolachas, as mesmas foram previamente trituradas, utilizando um moinho de café (Taurus). A atividade da água das bolachas foi determinada utilizando o equipamento HygroPalm HP23-AW (Rotronic) a uma temperatura de 20 ± 1 °C (a). Foram realizadas medições em triplicado para cada ensaio de bolachas doces e salgadas.

A determinação do teor de humidade das bolachas foi feita utilizando um medidor de humidade PMB 202 (aeADAM) (b) a uma temperatura de 130 °C. Foram realizadas medições em triplicado para cada ensaio de bolachas doces e salgadas.

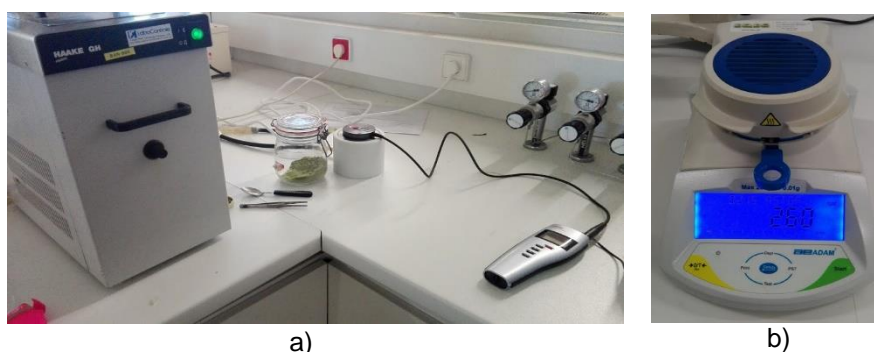


Figura 2.7 Medidor de a_w HygroPalm HP23-AW (a) e Medidor de humidade PMB 202 (b).

2.2.4. Caracterização reológica da massa das bolachas

A reologia dos alimentos é a ciência que estuda a deformação e o escoamento dos alimentos sob determinadas forças aplicadas, de forma a compreender a estrutura dos alimentos. É uma ciência exata e é considerada um ramo da física (Barnes *et al.*, 1989; Day e Golding, 2016).

A caracterização reológica envolve a quantificação das relações funcionais entre a deformação, tensões e as propriedades reológicas correspondentes, como a viscosidade, a elasticidade ou a viscoelasticidade, escoamento e recuperação (Day e Golding, 2016). A avaliação das propriedades reológicas é feita através de testes estáticos e dinâmicos ou oscilatórios. Nos testes dinâmicos aplica-se uma tensão ou deformação que varia sinusoidalmente com o tempo a uma determinada frequência. Estes testes são não destrutivos, ou seja, mantêm a estrutura interna da amostra e caracterizam-se por baixas tensões/deformações, incluindo os seguintes testes: testes de varrimento de frequências, testes de varrimento de tensões, testes de varrimento de temperatura e testes de varrimento de tempo. No teste de varrimento de tensões, a tensão varia ao longo do tempo para um determinado valor de frequência fixo (Figura 2.6). Este teste tem como objetivo determinar a zona de viscoelasticidade linear, ou seja, a gama de tensões para a qual a componente elástica (G') e a componente viscosa (G'') não variam com a tensão aplicada. Quanto mais estruturado é o material mais extensa é esta zona.

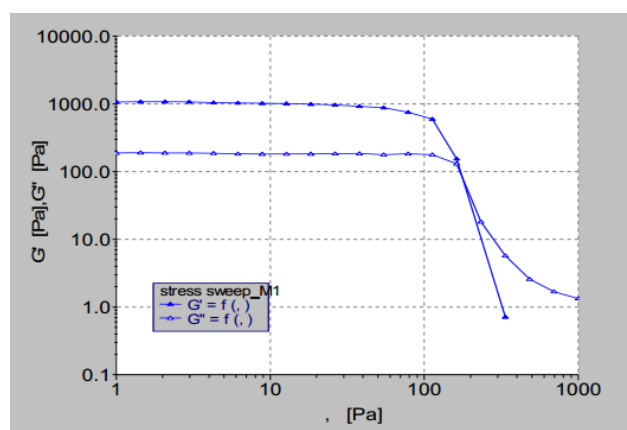


Figura 2.8 Exemplo de teste de varrimento de tensões.

No teste de varrimento de frequências (Figura 2.7) é aplicada uma tensão constante que está contida na zona de viscoelasticidade linear e registam-se as variações de G' e G'' em função da frequência, de modo a obter o espectro mecânico da amostra. A tensão a aplicar ao material deve ser a necessária para que este corresponda ao requerido sem que haja uma destruição da sua estrutura interna, permitindo compreender o tipo de ligações envolvidas na formação da sua estrutura tridimensional.

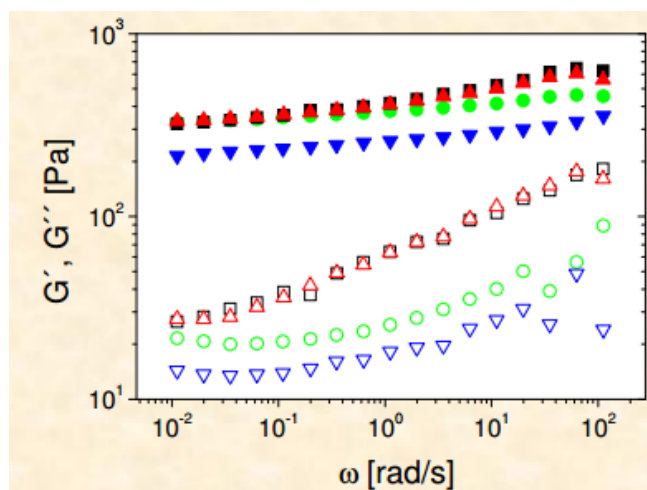


Figura 2.9 Exemplo de teste de varrimento de frequências.

2.2.4.1. Determinação da Viscoelasticidade linear – espectros mecânicos

As massas das bolachas com *Spirulina*, assim como do Controlo foram caracterizadas reologicamente. Utilizou-se um reómetro de tensão controlada (Haake RS-75, Alemanha), com banho recirculador de controlo de temperatura (Haake DC5), tendo todos os testes sido realizados a 20°C. Utilizou-se um sistema sensor de pratos paralelos serrados de 20 mm de diâmetro, com um intervalo (*gap*) de 1 mm, para todos os testes. Após colocação das amostras deixou-se repousar durante 5 min, antes de iniciar os testes, de forma a permitir a recuperação das amostras após compressão para atingir o *gap*. As amostras foram cobertas com parafina líquida, de modo a evitar a sua desidratação durante os testes.

Para todas as amostras, foram realizados testes oscilatórios de varrimento de tensão (*stress sweep*) para determinar a zona de viscoelasticidade linear. A tensão variou entre 0,01 e 2000 Pa, a uma frequência constante de 1 Hz. Realizaram-se testes oscilatórios de varrimento de frequência (*frequency sweep* - espectros mecânicos), a uma tensão constante (contida na zona de viscoelasticidade linear), para determinar as variações dos módulos viscoelásticos G' e G'' em função da frequência (0,006283 a 628,3 rad/s). Os testes foram realizados pelo menos em triplicado.

2.2.4.2. Determinação de Curvas de fluxo

Os fluidos ideais seguem a lei de Newton, enquanto os sólidos ideais seguem a Lei de Hooke. No entanto, a maioria dos alimentos tem um comportamento viscoelástico – propriedades intermédias entre os sólidos e os líquidos ideais (Barnes, 2000). Um fluido newtoniano é aquele cuja viscosidade não varia com a velocidade de deformação. Um fluido reofluidificante é aquele cuja viscosidade diminui com o aumento da velocidade de

deformação (à medida que uma determinada taxa de deformação é aplicada, a estrutura interna do material vai-se destruindo e por conseguinte a viscosidade diminui). Um fluido reopessante é aquele cuja viscosidade aumenta com o aumento da velocidade de deformação (quando a velocidade de deformação aumenta, há uma reorganização molecular ocorrendo agregação das moléculas e consequente aumento da viscosidade). As curvas de escoamento representam a variação da viscosidade em função da velocidade de deformação aplicada (figura 2.12).

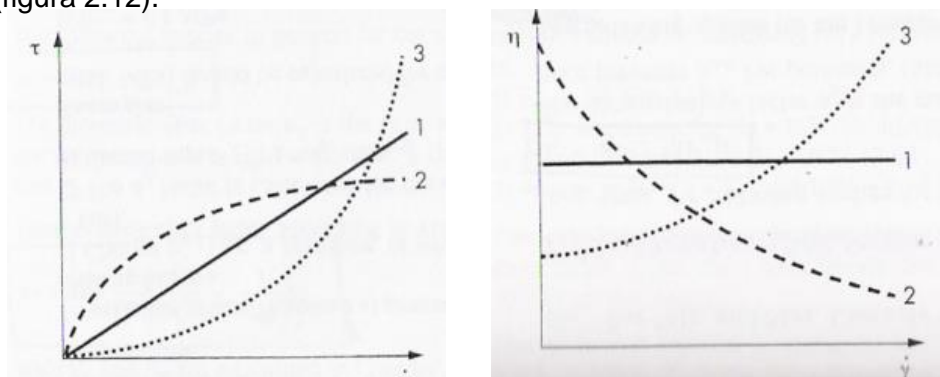


Figura 2.12 Curvas de escoamento e respetivas curvas de viscosidade de fluidos Newtonianos (1), Reofluidificantes (2) e Reopessantes (3) (Metzger, 2002).

No presente trabalho, realizaram-se curvas de escoamento para determinar a viscosidade aparente das amostras de massa em função da velocidade de deformação. Utilizou-se um reómetro de tensão controlada (MARS III - Haake, Alemanha), com um sistema sensor de pratos paralelos serrados de 20 mm de diâmetro, com um intervalo (gap) de 1 mm.

2.2.5. Caracterização química das bolachas

Foram realizadas análises de caracterização química em algumas amostras das bolachas doces e salgadas (Controlo e com a concentração de 2% de *Spirulina*).

2.2.5.1 Determinação do teor de cinzas totais das bolachas

O teor de cinza foi determinado por método gravimétrico através da norma portuguesa NP-518 (1986). Para a determinação do teor de cinzas totais, primeiro procedeu-se à calcinação dos cadinhos na mufla a 550 °C durante 1 h. Pesaram-se os cadinhos (M_0) depois de arrefecidos no exsiccador e pesou-se 1g de amostra para cada cadinho (M_1). A amostra foi carbonizada na placa de aquecimento até se encontrar completamente negra. Depois, calcinou-se a amostra na mufla a 550 °C durante pelo menos 2 h. Deixaram-se arrefecer os cadinhos dentro da mufla até aos 100-200 °C. Colocaram-se no exsiccador foram pesados (M_2). O procedimento foi feito em triplicado para cada amostra.

O teor de cinzas é calculado segundo a equação 11.

$$\% \text{ cinzas} = \frac{M_2 - M_0}{M_1} \times 100 \quad (11)$$

2.2.5.2 Determinação do teor de gorduras totais das bolachas

Para a determinação do teor de gorduras totais, foi realizado um pré-tratamento que consistiu em pesar 3 g de amostra para as bolachas doces e 5 g de amostra para as bolachas salgadas num balão de Erlenmeyer esmerilado (M_1) e adicionar 10 mL de etanol 95% (v/v), 8 mL de ácido fórmico 99% (v/v) e 12 mL de ácido clorídrico 70% (v/v) e homogeneizou-se. De seguida, adaptou-se o refrigerante de refluxo colocou-se o Erlenmeyer numa placa de aquecimento a ferver durante 20 minutos. Deixou-se arrefecer até à temperatura ambiente. Filtrou-se o líquido e lavou-se com 18 mL de etanol e água até pH neutro. Secou-se o filtro a 50 °C durante 30 minutos e colocou-se dentro de um cartucho de Soxhlet.

Para a extração da gordura, colocou-se o cartucho com a amostra dentro do extrator de Soxhlet e num balão esmerilado de 250 mL previamente tarado (M_0) colocou-se cerca de 220 mL de n-Hexano em cima de uma manta de aquecimento. Foi deixado a extrair durante 4h.

Para a evaporação do solvente, utilizou-se o rotavapor (R-100, Buchi) com o banho a 60 °C, a bomba de vácuo a 360 mbar, na posição de velocidade 4 e quando todo o solvente evaporou, secou-se o balão na estufa a 105 °C durante 1 h. Deixou-se arrefecer no exsiccador e pesou-se (M_2).

O teor de matéria gorda total é calculado segundo a equação 12.

$$\% \text{ matéria gorda total} = \frac{M_2 - M_0}{M_1} \times 100 \quad (12)$$

2.2.5.3 Determinação do teor de proteína bruta das bolachas

Para a determinação do teor de proteína bruta das amostras de bolachas utilizou-se o método de Kjeldhal. Primeiro procedeu-se à mineralização dos compostos orgânicos contidos na amostra por ácido sulfúrico (H_2SO_4) a quente, na presença de um catalisador metálico ($CuSO_4$). Para isso, pesou-se 0,5 g de amostra para um pedaço de papel vegetal (isento de azoto) e fez-se um ensaio em branco com papel vegetal. Colocou-se a amostra no tubo de Kjeldhal, adicionou-se uma pastilha de catalisador (1,5% $CuSO_4 \cdot H_2O$ + 2% Se) e 25 mL de H_2SO_4 (95-97%). De seguida, os tubos foram colocados no mineralizador (DKL) no programa CEREAL durante 4 h, primeiramente a 150 °C durante 20 minutos, de seguida a 250 °C durante 30 minutos, depois a 300 °C durante 90 minutos e por fim a 400 °C durante 120 minutos.

Após a mineralização, procedeu-se à destilação das amostras previamente digeridas por adição de NaOH, destilado em corrente de vapor e recolhido numa solução de ácido bórico (HBO_3). Colocou-se cada tubo de Kjeldhal no aparelho de destilação (UDK149, Velp Scientific), bem como um balão de Erlenmeyer (no tubo de recolha de destilado), onde se

adicionaram 4-5 gotas de indicador misto (vermelho de metilo e verde de bromocresol). A solução destilou durante cerca de 3 minutos e observou-se a mudança de cor da solução de rosa (meio ácido) para verde (meio básico) à medida que ia recebendo amoníaco.

Por fim, realizou-se a titulação do amoníaco presente na solução de ácido bórico, com uma solução de HCl 0,075 N padronizado.

O teor de azoto total presente na amostra é calculado segundo a equação 13.

$$\% \text{ azoto total} = \frac{(V_1 - V_0) \times 1,4 \times N}{M} \quad (13)$$

O teor de proteína bruta presente na amostra é calculado segundo a equação 14.

$$\% \text{ proteína bruta} = \% \text{ azoto total} \times \text{fator de conversão} \quad (14)$$

Onde:

V_1 = volume de HCl gasto na titulação da amostra em ensaio

V_0 = volume de HCl gasto na titulação do ensaio em branco

N = normalidade da solução de HCl

M = massa da amostra

Nota: O fator de conversão de azoto total em proteína bruta utilizado foi o do arroz (5,95).

2.2.5.4 Determinação do teor de fibra total das bolachas

Para a determinação do teor de fibra total das amostras das bolachas analisadas, seguiu-se o Método AOAC 991.43 (Método enzimático-gravimétrico, tampão MES-TRIS), tendo-se procedido a um pré-tratamento para remoção de açúcares e lípidos. Primeiro, verificou-se a humidade, pesando 7 g de amostra na balança analítica (AG200, Gehaka). Depois, num copo de precipitação contendo esta amostra seca adicionou-se 25 mL/g_{amostra} de éter de petróleo e agitou-se numa placa de agitação, tapado, durante 5 minutos. A seguir, fez-se a filtração, raspando o resíduo novamente para o copo e repetindo o procedimento anterior 3 vezes. No caso das bolachas doces, para a remoção dos hidratos de carbono, fez-se também o mesmo procedimento, mas com etanol 85% (10 mL/g_{amostra}). No final, colocaram-se os filtros a secar na estufa a 50°C durante 30 minutos.

Depois da amostra pré-tratada, procedeu-se à digestão enzimática, pesando 1 g de amostra (após desengorduramento e extração de açúcares) para um copo, adicionando 40 mL de solução tampão MES-TRIS 0,05 M (pH 8,3; 20°C), adicionou-se 50 µL de α-amilase (Sigma Aldrich) e agitou-se. Incubou-se no banho a 100°C durante 15 min, com agitação (na posição 7). De seguida, arrefeceu-se o banho a 60°C e adicionou-se 10 mL de água destilada

e 100 µL de protease (5 mg/ 100 µL solução tampão MES-TRIS) (Sigma Aldrich). Incubou-se no banho a 60°C durante 30 min, com agitação. Por fim, adicionou-se 5 mL de HCl 0,561 N e ajustou-se o pH a 4,0-4,7. Adicionou-se 300 µL de amiloglucosidase (Sigma Aldrich) e agitou-se. Finalmente, incubou-se no banho a 60 °C durante 30 min, com agitação.

Depois colocou-se o produto da digestão num frasco com tampa juntamente com 290 mL de etanol a 60°C e deixou-se precipitar a fibra solúvel durante 1h à temperatura ambiente. De seguida, procedeu-se à filtração sob vácuo recorrendo a um kitasato e a um cadinho filtrante com celite previamente tarado. Realizaram-se 2 lavagens com etanol 78%, etanol 95% e acetona). Por fim, levou-se o cadinho à estufa a secar a 130°C durante 24h e pesou-se. Cada ensaio foi realizado em quadruplicado, pois para cada amostra analisada, após secagem em estufa, dois cadinhos foram utilizados para determinação das cinzas totais (segundo método indicado em 2.2.5.1) e dois cadinhos foram utilizados para determinação da proteína bruta (segundo método indicado em 2.2.5.3), para corrigir o peso do resíduo de fibra total. Foi também realizado um ensaio em branco, sem amostra.

O teor de fibra total presente na amostra é calculado segundo a equação 15.

$$\% \text{ Fibra total} = \frac{\frac{(R1+R2)}{2} - P - C - B}{\frac{(M1+M2)}{2}} \times 100 \quad (15)$$

Onde: R1 e R2 são as massas dos resíduos de fibras, após digestão, filtração e secagem a 103°C, das amostras de cada ensaio em duplicado (mg)

P e C são as massas de proteína e cinza, respetivamente, determinadas nos resíduos de fibras de cada ensaio em duplicado (mg)

B é a massa do resíduo de fibras do ensaio em branco, após correção do teor de proteína e cinzas (mg)

e M1 e M2 são as massas das amostras de cada ensaio em duplicado, com correção do teor de humidade, gordura e açúcares (mg).

2.2.6. Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados experimentais foi feito recorrendo ao Software STATISTICA da StatSoft (versão 8.0) cedido pela Unidade de Investigação LEAF. Realizou-se uma análise de variância (ANOVA), para comparar e avaliar a existência de diferenças significativas para os diferentes parâmetros analisados. Utilizou-se o teste de comparação de médias de Scheffé – Post Hoc Comparison para um nível de significância estatística de 95% (p<0,05). Ao longo de toda a tese, os resultados são apresentados em termos de média ± desvio padrão.

Capítulo 3 – Resultados e discussão

3.1 Estudos da absorção de água e óleo da farinha de arroz

Os estudos de absorção de água e óleo das farinhas de arroz foram realizados de acordo com o descrito no capítulo 2.2.1. Nas Figuras 3.1 a), b), c) e d) estão representados os resultados obtidos para os parâmetros de *swelling power*, capacidade de absorção de água (CAA), solubilidade e *water binding capacity* (WBC), respectivamente, da farinha de arroz comercial.

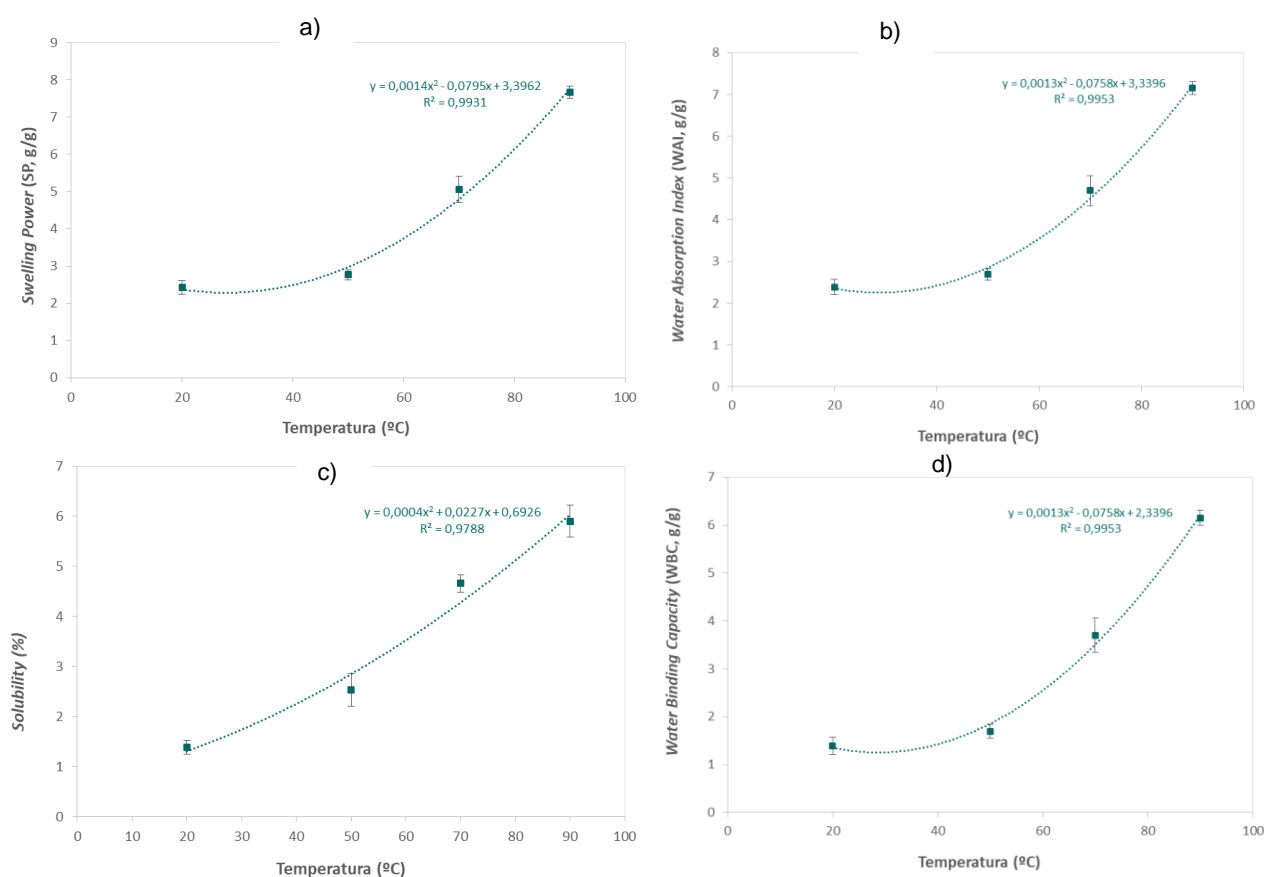


Figura 3.1 *Swelling power* (a), capacidade de absorção de água (b), solubilidade (c) e *water binding capacity* (d) da farinha de arroz comercial.

Ao analisar os gráficos da figura 3.1, podemos verificar que em todos os parâmetros a amostra de farinha de arroz comercial comporta-se de forma semelhante, havendo um aumento de cada parâmetro com o aumento da temperatura. Foram ajustadas equações polinomiais que poderiam sugerir um aumento destes parâmetros também para temperaturas mais baixas, no entanto este modelo é unicamente válido para o intervalo de temperaturas estudado (20-90°C).

Na figura 3.1 b), podemos observar que a capacidade de absorção de água das amostras de farinha de arroz comercial aumenta com a temperatura. A 90°C verifica-se um aumento significativo deste parâmetro em relação aos 20°C que pode ser explicado dada a ocorrência da gelatinização do amido. Em estudos ainda não publicados, estudou-se a capacidade de absorção de água nas farinhas de arroz agulha e carolino e verificou-se através das curvas ajustadas que a farinha comercial apresenta um comportamento mais próximo do da farinha de arroz agulha (índice de absorção de água = $0,0014T^2 - 0,0853T + 3,4858$) do que do arroz carolino (índice de absorção de água = $0,0009T^2 - 0,0411T + 2,6821$), indicando que a farinha comercial possa ser constituída maioritariamente por arroz agulha. Verificaram-se diferenças significativas entre as amostras sujeitas a diferentes temperaturas para todos os parâmetros ($p < 0,05$), exceto entre a farinha de arroz a 20°C e a 50°C para IAA e WBC. Deve notar-se que, segundo a literatura (Bhattacharya, 1979; Tako e Hizukuri, 1999) a temperatura de gelatinização do amido de arroz situa-se entre os 55°C e os 79°C, o que está de acordo com o maior incremento destes parâmetros de absorção de água acima dos 50°C (Figura 3.1).

Em relação à capacidade de absorção de óleo e de *oil binding capacity* da farinha de arroz comercial a 20°C, esta apresenta, respetivamente, um valor de $1,72 \pm 0,01$ e de $0,72 \pm 0,01$.

Segundo Fragoso (2016) ao adicionar microalgas, em particular *Spirulina*, à formulação base das bolachas (com farinha de trigo), o valor da capacidade de absorção de água (5,0 a 20°C) e de óleo (1,17 a 20°C) aumenta em relação ao valor da farinha sem microalga, o que pode ser benéfico, pois indica que será necessária uma maior quantidade de água para hidratação da massa, logo poderá ser requerida menor quantidade de farinha. Por outro lado, a *Spirulina* foi a microalga que apresentou maior valor de capacidade de absorção de água a 20°C, em relação a outras microalgas como *Phaeodactylum* e *Chlorella*. Este fato pode ser explicado devido à *Spirulina* apresentar parede celular constituída por polissacáridos que possui caráter mais hidrofílico do que as outras microalgas.

3.2. Caracterização das bolachas (e massas) doces com *Spirulina* e farinha de arroz

A preparação das bolachas doces foi feita de acordo com as etapas descritas no capítulo 2.2.2. Na figura 3.2 encontra-se o aspeto geral das bolachas doces depois de cozidas.



Figura 3.2 Bolachas doces de farinha de arroz Controlo e com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina* (da esquerda para a direita).

3.2.1. Dimensões das bolachas doces

A avaliação das dimensões foi feita de acordo com o capítulo 2.3.3.1.

Nas figuras 3.3 e 3.4 são apresentados os parâmetros de diâmetro, espessura e *spread-ratio* para as bolachas doces, com diferentes % de *Spirulina* e com diferentes % de farinha de arroz, respetivamente.

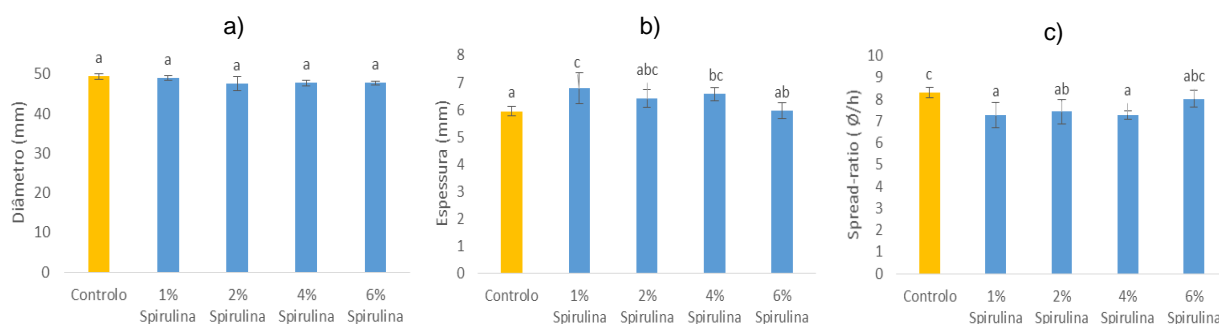


Figura 3.3 Diâmetro (a), espessura (b) e *spread-ratio* (c) obtidos para a bolacha doce Controlo e para as bolachas doces com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

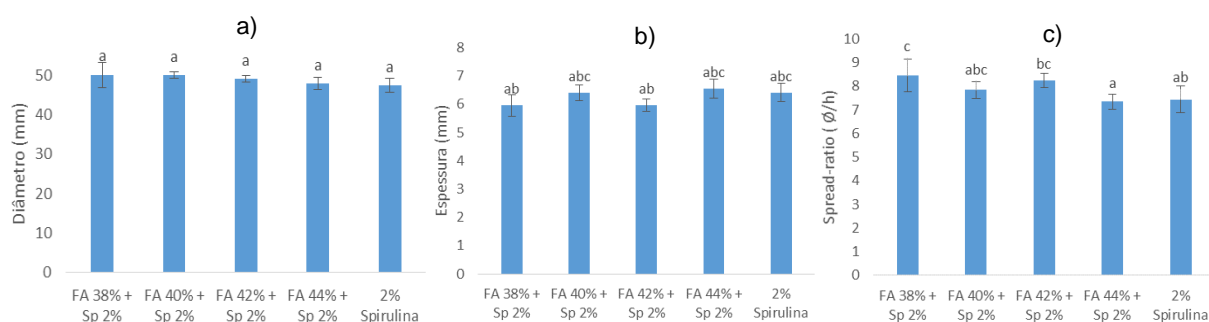


Figura 3.4 Diâmetro (a), espessura (b) e *spread-ratio* (c) das bolachas doces com 2% de *Spirulina* e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%). A amostra “2% *Spirulina*”, corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig 3.3.

Ao analisar as figuras 3.3 a) e 3.4 b), podemos verificar que o diâmetro das amostras não apresentam diferenças significativas ($p>0,05$) entre si. Relativamente à espessura, já se verificaram algumas diferenças significativas ($p<0,05$) entre as amostras, em particular nas bolachas com incorporação de 1% e 4% de *Spirulina* que apresentam espessura mais elevada que o controlo. Em relação ao *spread-ratio*, verifica-se uma tendência para valores significativamente ($p<0,05$) mais baixos para as amostras com *Spirulina*. A redução do teor de farinha, para a mesma concentração de alga, provoca poucas alterações significativas ($p<0,05$) nas dimensões das bolachas, exceto no caso do *spread ratio*, havendo como seria de esperar maior espalhamento com o aumento da % de água (e redução da % de farinha).

3.2.2. Cor das bolachas e das massas doces

A avaliação da cor das bolachas e das massas foi feita de acordo com o descrito no capítulo 2.2.3.2.

Os resultados obtidos para os parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^0 para a bolacha doce controlo e para as bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina* encontram-se na figura 3.5.

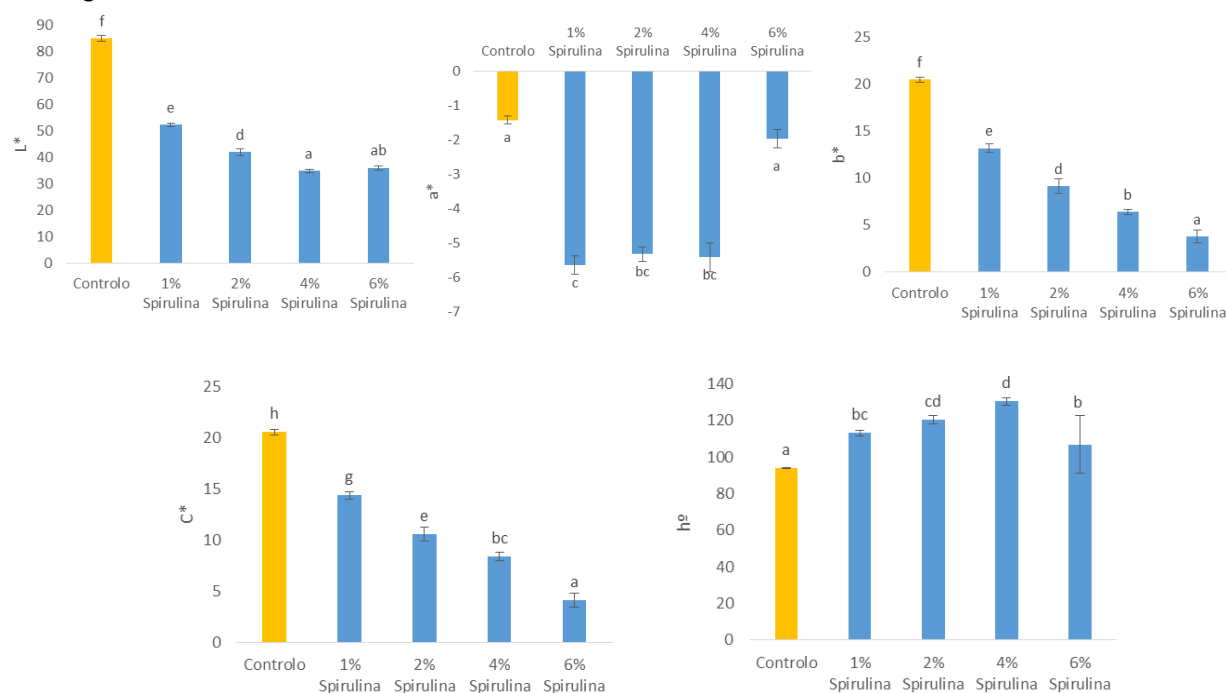


Figura 3.5 Parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^0 obtidos para a bolacha doce Controlo e para as bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

Através da análise da figura 3.5 e em particular do parâmetro L^* verifica-se uma diminuição significativa ($p<0,05$) da luminosidade com o aumento da concentração da microalga, o que significa que a adição de biomassa microalgal resulta na obtenção de bolachas mais escuras. Também é possível verificar que com o aumento da concentração de

microalga, há uma diminuição dos parâmetros cromáticos a^* , b^* (as bolachas com 1% são mais verdes e mais amarelas do que com 6%) e C^* (indica colorações menos intensas), sendo mais acentuada no parâmetro b^* , apesar de se notar uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as bolachas com adição de 6% de *Spirulina* no parâmetro a^* . Em relação ao parâmetro h° , este apresenta valores entre os 90° e os 130° (tonalidade entre o amarelo e o verde), sendo as bolachas controlo mais amarelas e as bolachas com microalga mais verdes.

Estes resultados não seriam de esperar, tendo em conta o aspeto das bolachas doces 6% parecerem apresentar uma cor verde mais intensa (figura 3.2). O facto de, ao aumentar a concentração de alga, se estar ao mesmo tempo a reduzir o teor de farinha, pode contribuir para este efeito. Em estudos anteriores, verificou-se um efeito semelhante para bolachas de trigo com *Spirulina* (Batista *et al.*, 2017), para bolachas com *Chlorella* (Gouveia *et al.*, 2007) e com *Isochrysis galbana* (Gouveia *et al.*, 2008), em que também houve uma diminuição dos parâmetros a^* , b^* e C^* quando se aumentava a concentração de microalga de 2% para 6% e de 0,5% para 3%, respetivamente. Este efeito poderá ser explicado devido a uma maior degradação de pigmentos durante a cozedura, o que faz com que em termos cromáticos, o escurecimento aliado à manutenção da tonalidade (h°), “mascarem” a redução da intensidade de cor.

Na tabela 6, encontram-se os resultados obtidos para a diferença total de cor entre a massa (antes da cozedura) e as bolachas das diferentes amostras.

Tabela 6. Variação de cor entre a massa e as bolachas doces com incorporação de 0%, 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

	ΔE^*
Controlo	5,02
1% <i>Spirulina</i>	14,90
2% <i>Spirulina</i>	12,13
4% <i>Spirulina</i>	9,28
6% <i>Spirulina</i>	7,68

Através da análise da tabela 6, podemos verificar que todos os resultados obtidos são superiores a 5, o que significa que as diferenças de cor são visíveis a olho nu (Castellar *et al.*, 2006). Verifica-se que as diferenças de cor após cozedura são maiores para as amostras com 1% de *Spirulina*, diminuindo com o aumento da concentração de microalga.

Os resultados obtidos para os parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h° para as bolachas doces com incorporação de 2% de *Spirulina* e variando a concentração de farinha de arroz - 38%, 40%, 42%, 44% - e *Spirulina* 2% (47% farinha) encontram-se na figura 3.6.

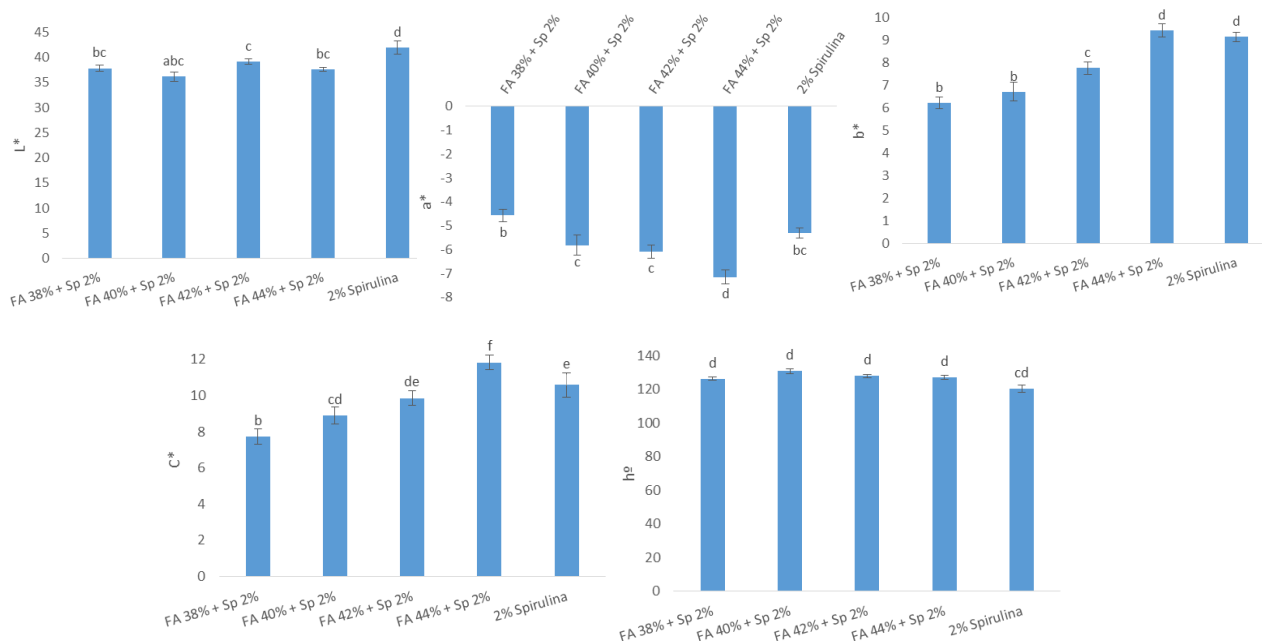


Figura 3.6 Parâmetros L*, a*, b*, C* e h° obtidos para as bolachas doces com incorporação de 2% de *Spirulina* e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%, 47%). A amostra “2% *Spirulina*” corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.5).

Através da análise da figura 3.6, podemos observar que não há diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as bolachas no parâmetro L* e h°, o que significa que a tonalidade verde é idêntica para todas as amostras ($h^\circ = 120 - 130^\circ$). No entanto, para a mesma concentração de alga, ao diminuir o teor de farinha verifica-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos parâmetros b* e C*, o que indica uma redução da intensidade da componente amarela da cor destas bolachas.

3.2.3. Atividade da água e teor de humidade das bolachas doces

A avaliação da atividade de água (a_w) e do teor de humidade das bolachas foi feita de acordo com o descrito no capítulo 2.2.3.4.

Nas figuras 3.7 e 3.8, encontram-se os resultados obtidos do teor de humidade e do a_w para as bolachas doces.

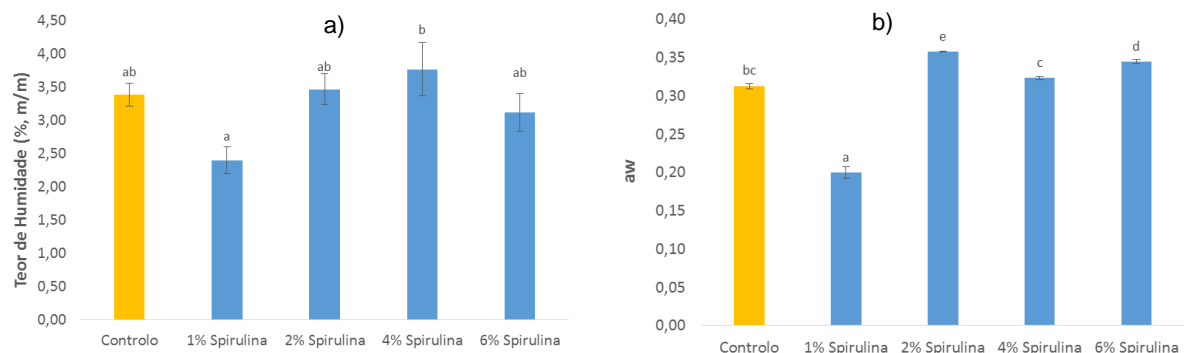


Figura 3.7 Teor de humidade (a) e atividade da água (a_w) (b) da bolacha doce controlo e das bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

Através da análise da figura 3.7, podemos verificar que o teor de humidade das bolachas não varia significativamente ($p < 0,05$) com o teor de *Spirulina*. Em relação ao a_w , as bolachas com *Spirulina* apresentam valores semelhantes ou superiores à bolacha Controlo, exceto para 1% *Spirulina* (possivelmente devido a erro experimental). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Batista *et al.*, (2017) para bolachas de trigo com *Spirulina*. Deve notar-se que todas as amostras apresentam valores de a_w abaixo de 0,5, o que é importante para a conservação das bolachas, pois diminui a taxa de proliferação microbial e as reações de oxidação de lípidos presentes neste tipo de alimentos com cerca de 20% de gordura.

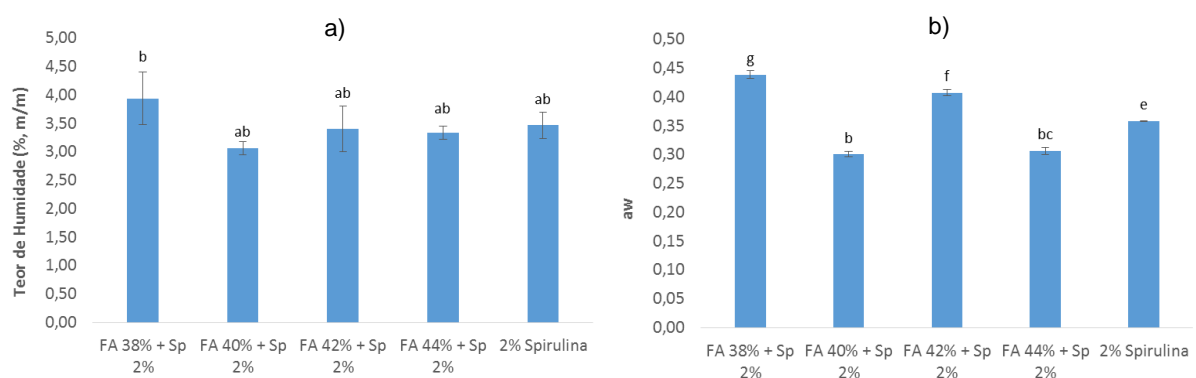


Figura 3.8 Teor de humidade (a) e atividade de água (a_w) (b) das bolachas doces com 2% de *Spirulina* e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%, 47%). A amostra “2% *Spirulina*” corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.7).

Ao observar a figura 3.8, podemos verificar que o teor de humidade das bolachas com diferentes concentrações de farinha de arroz não apresenta diferenças significativas ($p < 0,05$), apesar de se diminuir o teor de água à medida que se aumentou a quantidade de farinha de arroz. Isto poderá acontecer devido à variação de concentração ser pequena, bem como as

perdas de água durante a cozedura serem equivalentes. Como se esperava, a bolacha onde se notou maior diferença de a_w foi a amostra com 38% de farinha de arroz ($0,44 \pm 0,01$), pelo que todas as outras bolachas apresentaram valores significativamente ($p < 0,05$) mais baixos ($0,30-0,41$). Estes valores indicam que as bolachas apresentam um tempo de prateleira relativamente longo por haver baixa probabilidade de proliferação de microrganismos.

3.2.4. Análise do perfil de textura das bolachas doces

A textura das bolachas foi medida de acordo com os métodos descritos no capítulo 2.2.3.3. Dos texturogramas obtidos, calculou-se a Firmeza (N), definida como força máxima realizada pela sonda no teste de *bending*, a Área (N.s), ou trabalho de penetração, calculada pela área sob a curva força *versus* tempo de cada texturograma do teste de penetração, a fraturabilidade (mm) do teste de *bending* e do teste de penetração, calculada através da distância percorrida pela sonda até ao pico de força máxima. Estes parâmetros foram os calculados devido a serem os que permitem melhor discriminação entre as amostras, assim como serem os recomendados pelos métodos do teste de *bending* e do teste de penetração da Stable Microsystems. Na figura 3.9 e 3.10 encontram-se os resultados obtidos dos testes de *bending* e de penetração para as bolachas doces.

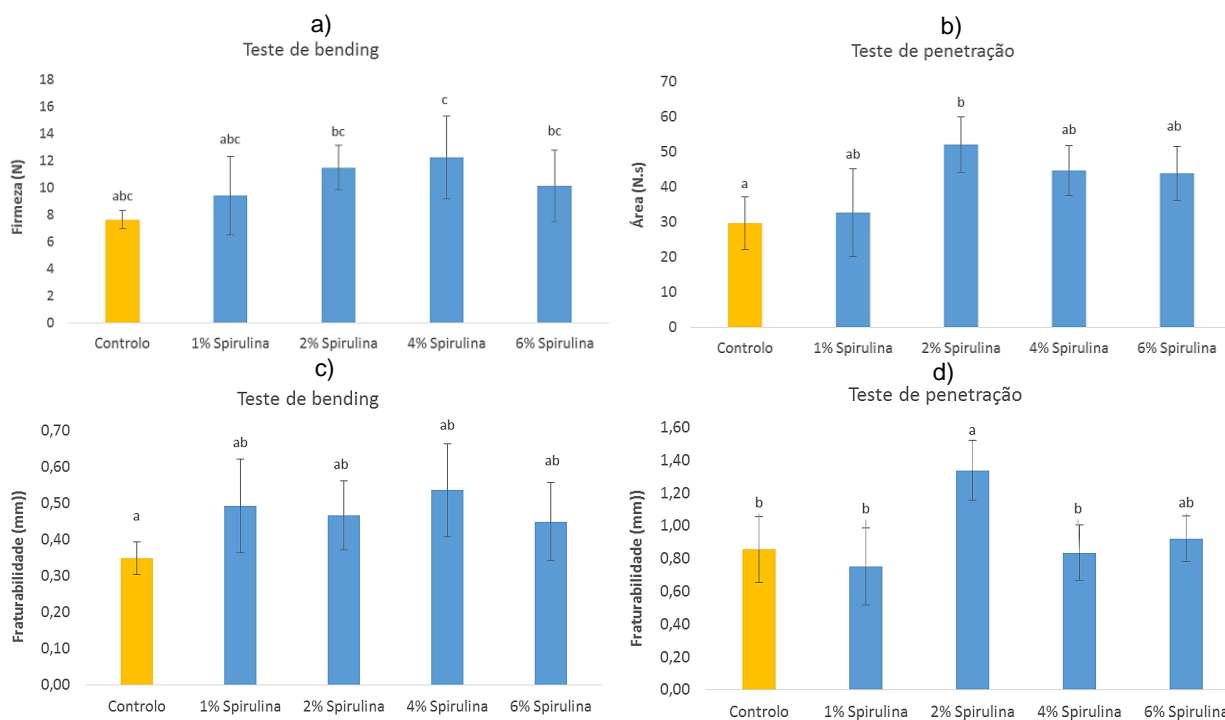


Figura 3.9 Firmeza (a), área (b), fraturabilidade do teste de *bending* (c) e fraturabilidade do teste de penetração (d) da bolacha doce Controlo e das bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

Ao analisar os dados referentes à firmeza e à fraturabilidade do teste de *bending* presentes na figura 3.9, é possível verificar que independentemente da concentração utilizada não existem diferenças significativas ($p>0,05$) entre as bolachas. No entanto, verifica-se uma tendência para o aumento da firmeza com o aumento da concentração de *Spirulina*, o que vai de encontro a resultados anteriores em bolachas de trigo com adição de microalgas (Gouveia et al., 2007; 2008b; Batista et al., 2017). No parâmetro da área de trabalho realizado pela sonda do teste de penetração, existe uma diferença significativa ($p<0,05$) entre a bolacha Controlo e a bolacha 2% *Spirulina*, sendo que esta apresenta os valores mais altos comparativamente às outras bolachas ($29,75 \pm 7,46$ e $52,03 \pm 7,88$ N.s, respetivamente). O mesmo se verifica para o parâmetro fraturabilidade, em modo de penetração. Este efeito poderá dever-se à composição da bolacha em farinha de arroz que possui um sistema diferente do da farinha de trigo por não possuir glúten, o que poderá criar uma menor homogeneização da mistura para concentrações de microalga mais altas e consequentemente as bolachas ficam mais quebradiças.

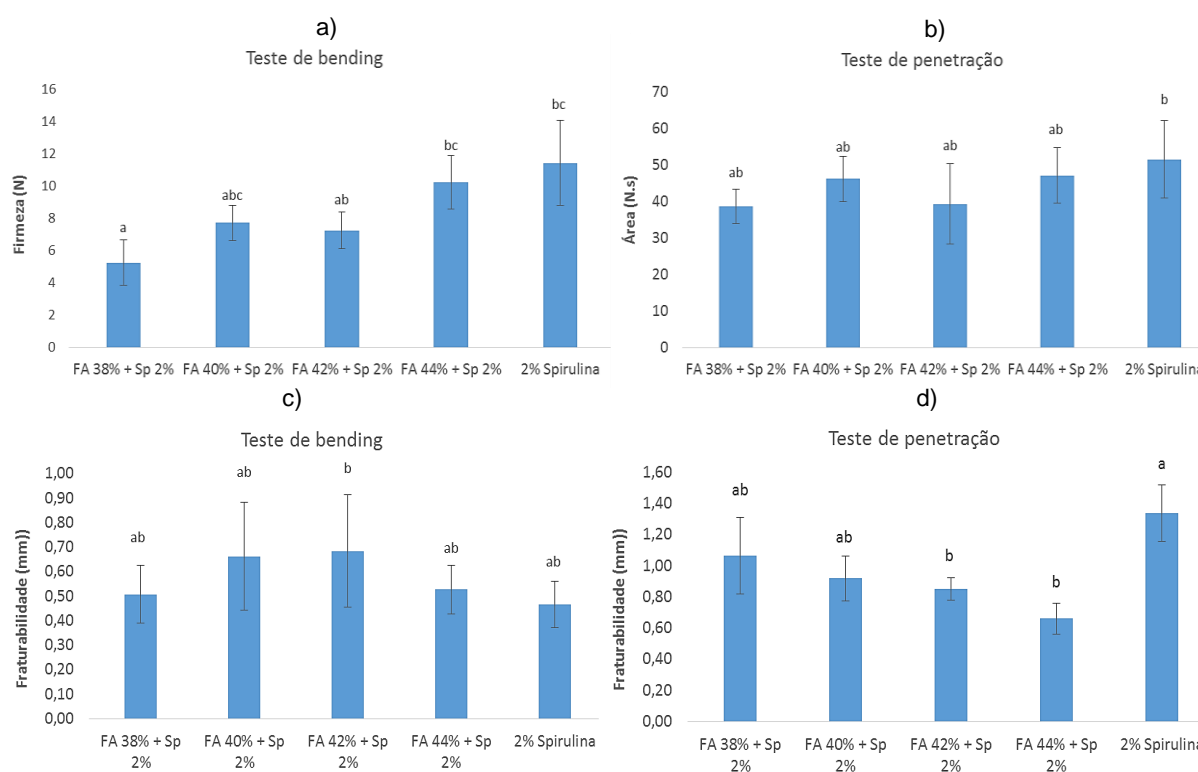


Figura 3.10 Firmeza (a), área (b), fraturabilidade do teste de *bending* (c) e fraturabilidade do teste de penetração (d) das bolachas doces com 2% de *Spirulina* e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%). A amostra “2% *Spirulina*” corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.9).

Ao analisar os resultados obtidos da figura 3.10, podemos verificar que a firmeza (teste de *bending*) das bolachas diminuiu significativamente ($p<0,05$) com a redução do teor de

farinha (e consequente aumento de água), mantendo a concentração de *Spirulina* a 2%, como seria de esperar. Em relação ao parâmetro da fraturabilidade do teste de *bending*, não se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as diferentes bolachas. Relativamente ao teste de penetração, as diferenças na área das diferentes bolachas não são significativas ($p < 0,05$). Na fraturabilidade do teste de penetração, as bolachas FA 42% e 44% apresentam valores significativamente ($p < 0,05$) diferentes em relação à bolacha 2% *Spirulina* ($0,66 \pm 0,10$ e $1,34 \pm 0,18$). Estes valores não seriam de esperar, visto que com o aumento da farinha de arroz, a bolacha fica mais dura e menos quebradiça. Deste modo, poderá ter havido um erro associado à medição da fraturabilidade do teste de penetração, dado que as diferentes amostras foram medidas em dias diferentes e a humidade atmosférica pode ter influenciado os resultados.

Na figura 3.11 encontra-se a variação da firmeza das bolachas doces com o aumento da concentração de farinha de arroz entre 38% e 47%.

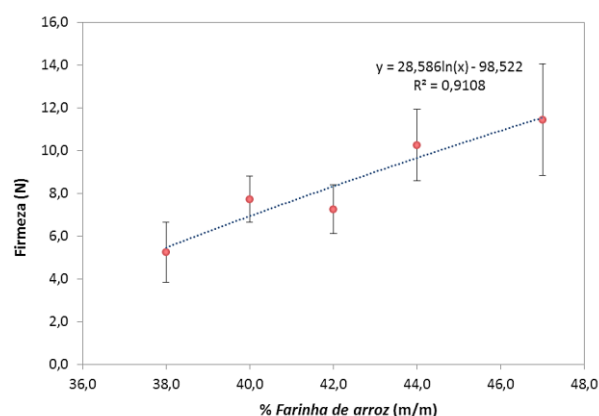


Figura 3.11 Variação da firmeza (teste de *bending*) das bolachas doces com o aumento da concentração de farinha de arroz.

Através da análise do gráfico da figura 3.11, é possível observar que quanto maior a percentagem de farinha de arroz nas bolachas, maior a firmeza obtida. O aumento da concentração de farinha de arroz (38% a 47%) na formulação das bolachas faz com que a firmeza do teste de *bending* aumente de $5,3 \pm 1,4$ N para $11,4 \pm 2,6$ N. Este efeito pode ser explicado pela maior concentração de grânulos de amido que forma uma estrutura mais firme. Em Mancebo *et al.* (2016), estudou-se o desenvolvimento de bolachas sem glúten com farinha de arroz, amido de milho e proteína de ervilha, tendo-se verificado valores de firmeza (F_{max}) mais elevados para as formulações com 100% de farinha de arroz.

3.2.5. Caracterização reológica das massas das bolachas doces

A caracterização reológica das massas das bolachas foi feita de acordo com os métodos descritos no capítulo 2.2.4. Os testes de varrimento de tensão foram efetuados para identificar a região de viscoelasticidade linear e encontram-se em Anexo 2. Todos os ensaios foram precedidos do teste de varrimentos de tensão, para garantir que se utilizam tensões oscilatórias contidas no intervalo de viscoelasticidade linear. Os espectros mecânicos obtidos para as bolachas doces controlo e com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% encontram-se na figura 3.12.

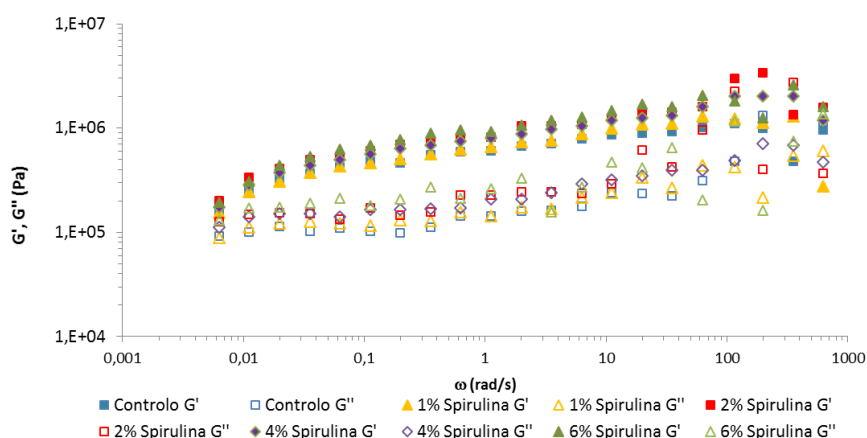


Figura 3.12 Espectro mecânico das massas das formulações de bolachas doces Controlo, 1% *Spirulina*, 2% *Spirulina*, 4% *Spirulina* e 6% *Spirulina*.

Ao analisar o espectro mecânico da figura 3.12, é possível verificar que em todas as amostras, o módulo elástico (G') é sempre superior ao módulo viscoso (G''), o que permite constatar uma estrutura viscoelástica firme da massa das bolachas e a predominância de um comportamento elástico. No entanto verifica-se uma dependência dos módulos em relação à frequência e uma tendência para “cross-over” para baixas e altas frequências, sendo a diferença entre G' e G'' inferior a uma década ($\tan \delta > 0,1$), o que revela tratar-se de materiais relativamente instáveis. Deve tratar-se que estas massas não são produtos acabados, mas apenas materiais intermediários do processamento que se estão a avaliar reologicamente de forma a obter alguma informação acerca do impacto estrutural da adição de *Spirulina*. A formulação com 6% de *Spirulina* é a que apresenta maior estruturação devido a apresentar valores de G' e G'' superiores às outras formulações. Este resultado comprova a função estruturante da microalga, como já foi observado através dos resultados da textura. Estes resultados foram também observados para massas de bolachas de trigo com adição de *Spirulina* por outros autores (Fragoso, 2016).

Tendo em conta a capacidade estruturante da *Spirulina* nas massas e nas bolachas decidiu-se avaliar a possibilidade de reduzir o teor de farinha, substituindo por água. Os espectros mecânicos obtidos para as bolachas controlo e com 2% de *Spirulina*, variando a concentração de farinha de arroz (38%, 40%, 42%, 44% e 47%) encontram-se na figura 3.13.

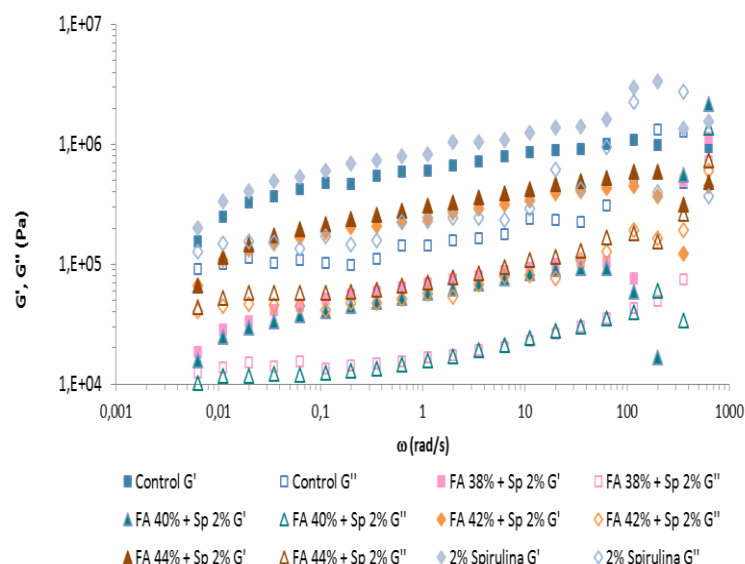


Figura 3.13 Espectro mecânico das massas das formulações de bolachas doces com 2% de *Spirulina* e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%, 47%). A amostra “2% *Spirulina*”, corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.12.

Ao analisar os espectros mecânicos da figura 3.13, é possível verificar que em todas as formulações o módulo elástico (G') é sempre superior ao módulo viscoso (G''), indicando um comportamento predominantemente elástico. Verifica-se também que as massas que têm na sua composição 47% e 44% de farinha de arroz apresentam maiores valores de G' e G'' em relação às outras formulações. As formulações que contêm 38%, 40% e 42%, por sua vez, possuem um comportamento semelhante entre si e valores de G' e G'' inferiores. Nestes espectros também se observa uma diferença entre os valores de G' e G'' inferior a uma década e uma acentuada dependência da frequência.

Em estudos anteriores (Fragoso, 2016), comparou-se os valores médios de G' à frequência de 1 Hz para as diferentes amostras analisadas de massas de bolachas de *Spirulina*, variando a concentração de farinha de trigo (mantendo 6% de *Spirulina*) e verificou-se que era possível reduzir o teor de farinha de trigo de 47% para 37%, mantendo os valores dos módulos viscoelásticos semelhantes ao da massa controlo. No presente estudo de diminuição do teor de farinha de arroz, considerando que os valores de G' são bastante mais elevados, utilizou-se apenas 2% de *Spirulina*, tendo sido possível reduzir de 47% para 42%

de farinha de arroz, de modo a manter os valores de G' e G'' semelhantes aos da massa controlo de trigo (produto-alvo).

Os resultados obtidos para o módulo viscoelástico (G'), à frequência fixa de 1 Hz, para as bolachas doces encontram-se representados nas figuras 3.14 e 3.15.

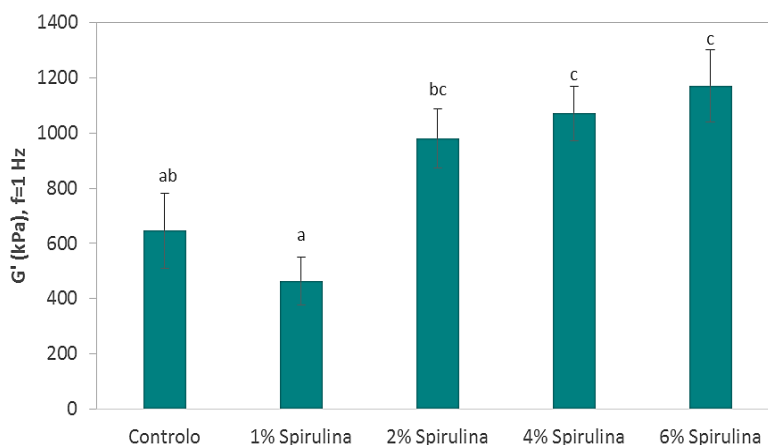


Figura 3.64 Valores de G' a 1 Hz para as formulações de bolachas doces Controlo, 1% *Spirulina*, 2% *Spirulina*, 4% *Spirulina* e 6% *Spirulina*.

Ao analisar os resultados obtidos na figura 3.14, é possível verificar que o módulo viscoelástico varia entre 400 e 1100 kPa. Não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a bolacha controlo e as bolachas com 1% e 2% de *Spirulina*, sendo que as outras bolachas apresentam valores significativamente ($p < 0,05$) superiores. As bolachas 4% e 6% *Spirulina* são as que apresentam maior módulo viscoelástico, como era de esperar.

Em estudos anteriores (Carrilho, 2014), observou-se um comportamento de certa forma semelhante, quando se adicionou 5% de farelo de arroz à formulação de bolachas sem glúten. Nesse caso, os valores de G' e G'' aumentaram quando comparado à massa sem adição de farelo e a massa ganhou um maior nível de estruturação. O mesmo acontece com a incorporação de *Spirulina* nas bolachas sem glúten, funcionando com um ingrediente estruturante.

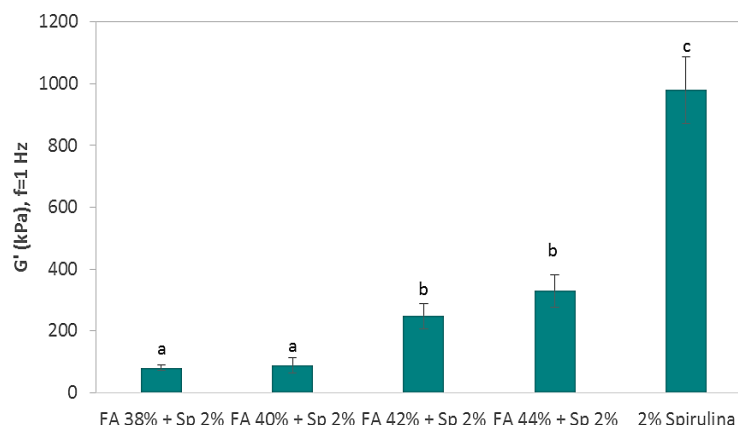


Figura 3.65 Valores de G' para as formulações de bolachas doces com 2% de *Spirulina* e variando a concentração de farinha de arroz (FA 38%, 40%, 42%, 44%, 47%). A amostra “2% *Spirulina*”, corresponde à formulação “base” com 47% FA, também representada na Fig. 3.14.

Ao analisar os valores de G' da figura 3.15, podemos afirmar que as bolachas com 38% e 40% de farinha de arroz apresentam valores semelhantes ($p > 0,05$), assim como as bolachas 42% e 44% que apresentam um valor superior, e as bolachas com 47% de farinha da formulação base apresentam o valor significativamente ($p < 0,05$) mais elevado (980 kPa). Na realidade, pode verificar-se um aumento exponencial de G' com o aumento do teor de farinha de arroz: $G'_{1\text{Hz}} \text{ (kPa)} = 0.0012 e^{(0.2886 \times \% \text{farinha de arroz})}$ ($R^2 = 0.9588$).

Estes resultados vão de encontro ao esperado e aos resultados obtidos relativamente à firmeza já anteriormente comprovados. Deve notar-se que os valores de $G'_{1\text{Hz}}$ das bolachas de arroz são muito mais altos que os valores observados para bolachas de trigo (100-300 kPa) em estudos anteriores (Fragoso, 2016). Com apenas 2% de *Spirulina*, ao reduzir o teor de farinha de arroz (e aumentando o teor de água) obtêm-se massas com propriedades reológicas semelhantes às massas de bolachas de trigo (produto alvo). No entanto, devido ao elevado teor de água (13-19%), estas massas tornam-se bastante adesivas dificultando o processo de molde. Estudos futuros deverão focar-se em otimizar estas formulações para ultrapassar este aspeto.

Na figura 3.16 encontram-se as curvas de escoamento para as massas com formulação Controlo, 1% *Spirulina*, 2% *Spirulina*, 4% *Spirulina* e 6% *Spirulina*.

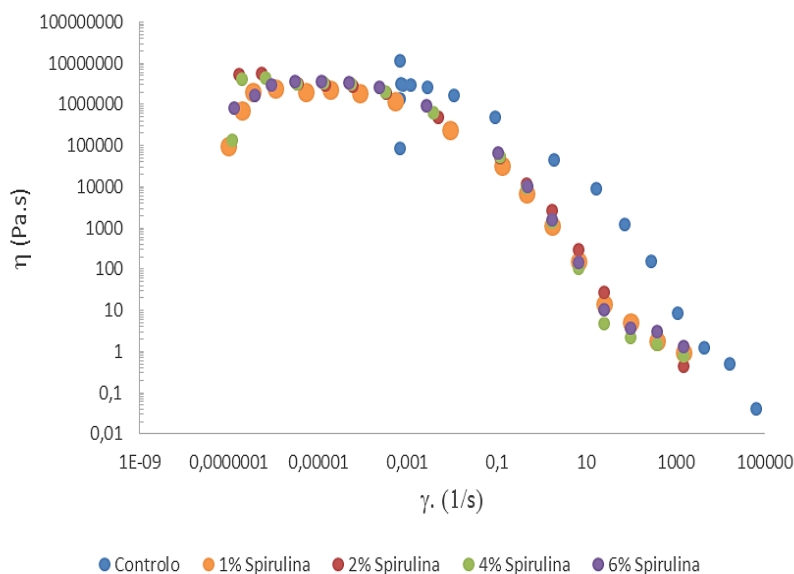


Figura 3.66 Curvas de escoamento para as massas com formulação de bolachas doces Controlo, 1% *Spirulina*, 2% *Spirulina*, 4% *Spirulina* e 6% *Spirulina*.

Através da análise das curvas de escoamento da figura 3.16, é possível verificar que para todas as formulações há um ligeiro aumento da viscosidade com o aumento da velocidade de deformação numa primeira fase, indicando um comportamento reopessante, posteriormente a viscosidade diminui com o aumento da velocidade de deformação (há uma quebra das ligações entre as moléculas e a estrutura é destruída), indicando um comportamento reofluidificante. As curvas de fluxo das diferentes formulações apresentam curvas muito semelhantes entre si, verificando-se um aumento da viscosidade aparente com o aumento da concentração de *Spirulina*.

Estes resultados mostram-se concordantes com os resultados dos espectros mecânicos acima apresentados (figura 3.12), evidenciando um poder estruturante acentuado através da adição de *Spirulina*. Estes resultados, por sua vez, revelaram-se bastante promissores, na medida em que a adição de *Spirulina* possibilita a diminuição do teor de farinha nas formulações das bolachas e confere-lhes mais estrutura, funcionando de certa forma como um mimético do glúten. Este é um caminho promissor que pode dar origem a novos produtos sem glúten, mantendo as características sensoriais dos produtos com glúten.

3.3.Caracterização das bolachas (e massas) salgadas com *Spirulina* e farinha de arroz

A preparação das bolachas salgadas foi feita de acordo com as etapas descritas no capítulo 2.2.1. Na figura 3.17, encontra-se o aspeto geral das bolachas salgadas.



Figura 3.17 Aspeto geral das bolachas salgadas com farinha de arroz Controlo e com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina* (da esquerda para a direita).

3.3.1. Dimensões das bolachas salgadas

Na figura 3.18, são apresentados os parâmetros de diâmetro, espessura e *spread-ratio* para as bolachas salgadas.

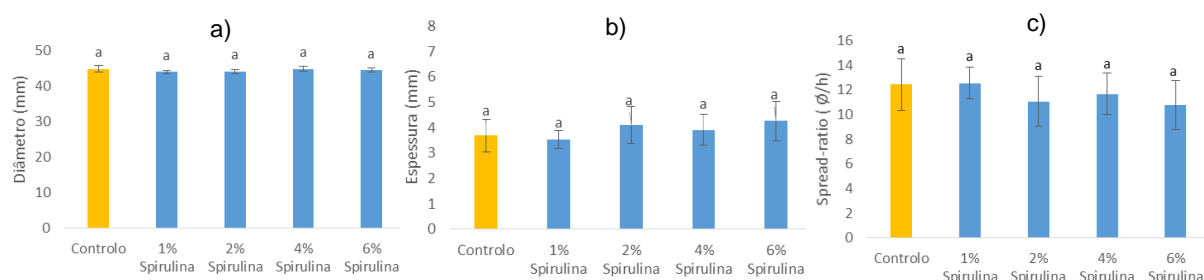


Figura 3.18 Diâmetro (a), espessura (b) e *spread-ratio* (c) obtidos para a bolacha salgada Controlo e para as bolachas doces com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

Ao analisar a figura 3.18, é possível verificar que não existem diferenças significativas ($p>0,05$) entre as diferentes formulações em relação ao diâmetro, espessura e *spread-ratio*. Devido à massa não ser passível de passar por uma laminadora antes do corte, a laminação foi feita de forma manual, o que poderia ter levado a diferenças entre as bolachas, o que não foi o caso, por isso é possível concluir que a laminação manual não afetou os resultados da espessura. De qualquer forma deve notar-se que no caso das bolachas de arroz foi imprescindível adicionar um emulsionante (lecitina de soja) para conseguir amassar, laminar e moldar as bolachas sem que estas se desintegrassem.

3.3.2. Cor das bolachas e das massas salgadas

Os resultados obtidos para os parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^0 para a bolacha salgada controle e para as bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina* encontram-se na figura 3.19.

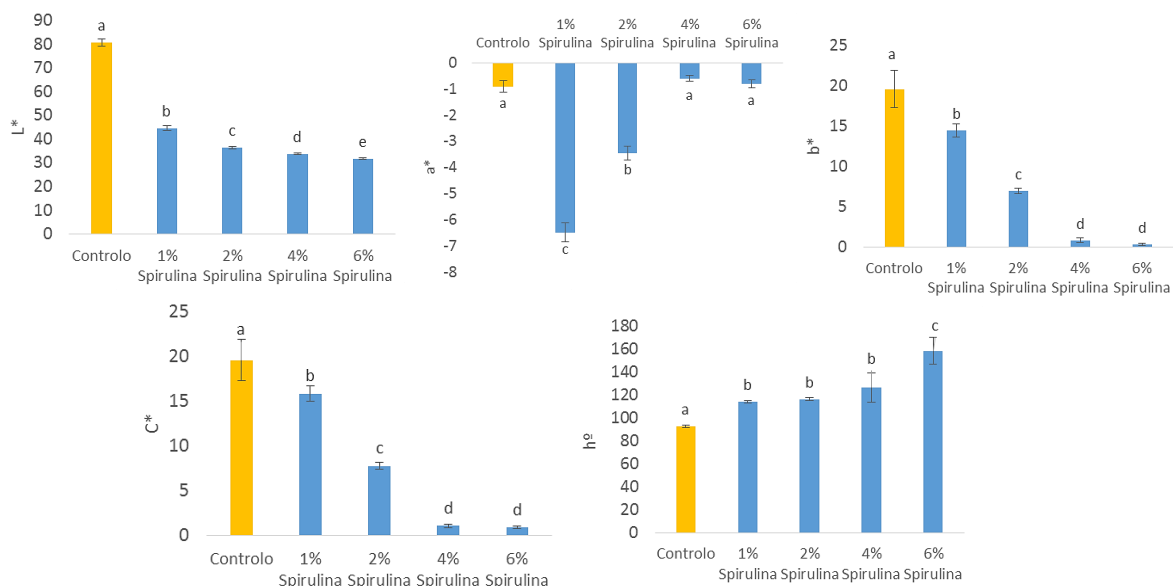


Figura 3.19 Parâmetros L^* , a^* , b^* , C^* e h^0 obtidos para a bolacha salgada controle e para as bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

Analisando os resultados obtidos da figura 3.19, é possível observar que há uma diminuição dos parâmetros cromáticos L^* , a^* , b^* e C^* com o aumento da concentração de microalga (as bolachas com 1% de *Spirulina* são menos escuras, mais amarelas e com maior intensidade de cor do que as bolachas com 6%), apresentando valores com diferenças significativas ($p < 0,05$). No parâmetro cromático a^* , observa-se uma diminuição das bolachas de 1% para 6% de *Spirulina*. Este resultado indica que as bolachas ficam com uma cor verde menos intensa com o aumento da concentração de microalga, tal como se verificou nas bolachas doces (secção 3.2.2). O parâmetro cromático h^0 varia entre 90° e 160° , o que indica que a tonalidade das bolachas varia entre o amarelo e o verde, sendo as bolachas controle mais amarelas e as bolachas com maior concentração de microalga mais verdes. Estes resultados estão de acordo com os obtidos para as bolachas doces (3.2.2).

Na tabela 7, encontram-se os resultados obtidos para as diferenças de cor entre a massa (antes da cozedura) e as bolachas das diferentes amostras.

Tabela 7. Variação de cor entre a massa e as bolachas salgadas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

	ΔE^*
Controlo	11,00
1% <i>Spirulina</i>	10,07
2% <i>Spirulina</i>	7,37
4% <i>Spirulina</i>	8,55
6% <i>Spirulina</i>	9,27

Através da Tabela 7, é possível concluir que as bolachas que apresentaram maior diferença de cor entre a massa e a bolacha depois de cozida foram as bolachas Controlo, ao contrário dos resultados obtidos nas bolachas doces, em que a maior diferença se verificou nas bolachas com 1% de *Spirulina*. No entanto, estes valores podem ser explicados pela espessura da bolacha salgada que ao ser mais fina, pode traduzir-se num maior escurecimento em relação à massa controlo. As diferenças verificadas foram todas maior que 5, o que indica que são visíveis a olho nu (Castellar *et al.*, 2006).

3.3.3. Atividade da água e teor de humidade das bolachas salgadas

Na figura 3.20, encontram-se os resultados obtidos do teor de humidade e do a_w para as bolachas salgadas.

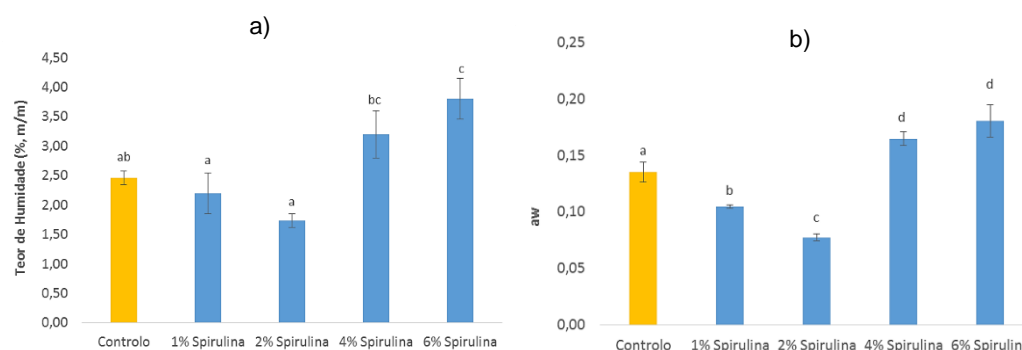


Figura 3.20 Teor de humidade (a) e atividade de água (a_w) (b) da bolacha salgada Controlo e das bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

Ao analisar os gráficos da figura 3.20, é possível observar que as amostras com 1% e 2% de *Spirulina* apresenta valores de humidade e a_w próximos do Controlo, enquanto as amostras com 4% e 6% de *Spirulina* apresentam valores superiores para estes parâmetros. Verifica-se portanto uma tendência para o aumento do teor de humidade e a_w com a adição de alga, mais evidente que no caso das bolachas doces (3.2.3). Deve notar-se que para todas as amostras os valores de a_w são muito baixos (entre 0,08 e 0,18), o que contribui para um baixo desenvolvimento de microrganismos e consequente longo tempo de prateleira. Para além disso estes valores muito baixos de a_w resultam numa textura crocante, essencial para

este tipo de produto. Num trabalho realizado (Batista *et al.*, submetido) com bolachas de trigo salgadas obtiveram-se valores de a_w semelhantes (0,12-0,22), o que significa que foi possível desenvolver um produto sem glúten com características semelhantes ao produto alvo (*crackers* de trigo).

3.2.4. Análise do perfil de textura das bolachas salgadas

Na figura 3.21 encontram-se os resultados obtidos dos testes de *bending* e de penetração para as bolachas salgadas.

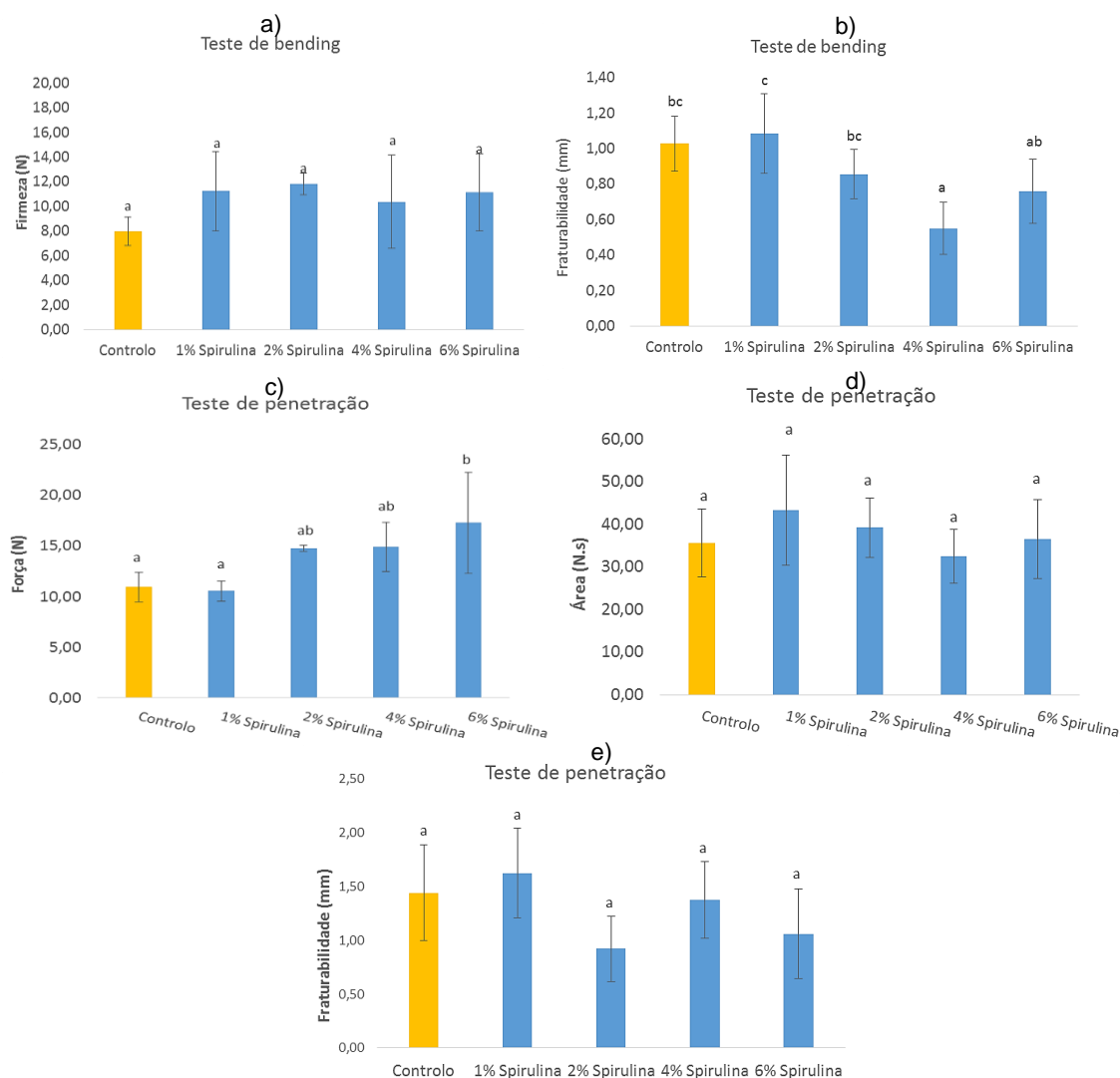


Figura 3.21 Firmeza (a), fraturabilidade do teste de *bending* (b), força (c), área (d) fraturabilidade do teste de penetração (e) da bolacha salgada controlo e das bolachas com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

Ao analisar os gráficos da figura 3.21, relativamente ao parâmetro de firmeza do teste de *bending*, à área e à fraturabilidade do teste de penetração não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as bolachas. Em relação ao parâmetro de fraturabilidade do teste

de *bending*, observaram-se valores significativamente diferentes ($p < 0,05$) entre a bolacha de 1% e 4% de *Spirulina*, sendo a fraturabilidade da bolacha de 4% mais baixa do que a de 1%. Sendo estes resultados pouco discriminantes das amostras decidiu-se calcular também o valor da força máxima para o teste de penetração. Neste caso, verificou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) da bolacha Controlo para a bolacha com 6% de *Spirulina*. Estes resultados indicam a existência de maior estruturação da bolacha para concentrações de microalga mais altas, tal como acontece com as bolachas doces (3.2.4). Alguns resultados da textura, como a firmeza, a área e a fraturabilidade do teste de penetração, apresentaram maior variabilidade devido ao fato das bolachas salgadas serem mais quebradiças do que as bolachas doces. Os valores de firmeza das *crackers* de arroz são mais baixos do que os obtidos em estudos anteriores (Batista *et al.*, submetido) com farinha de trigo (16-20 N teste *bending*), o que evidencia uma estrutura mais frágil para produtos sem glúten. Em bolachas salgadas tipo *crackers* comerciais “Fantastic crackers” (Itália), obteve-se valores de firmeza de $16,77 \text{ N} \pm 3,81$ no teste *bending* (resultados não apresentados nesta tese), o que indica valores superiores comparativamente às *crackers* de arroz Controlo ($7,98 \text{ N} \pm 1,16$).

3.2.5. Caracterização reológica das massas das bolachas salgadas

Os espectros mecânicos obtidos para as massas de bolachas salgadas controlo e com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% encontram-se na figura 3.22.

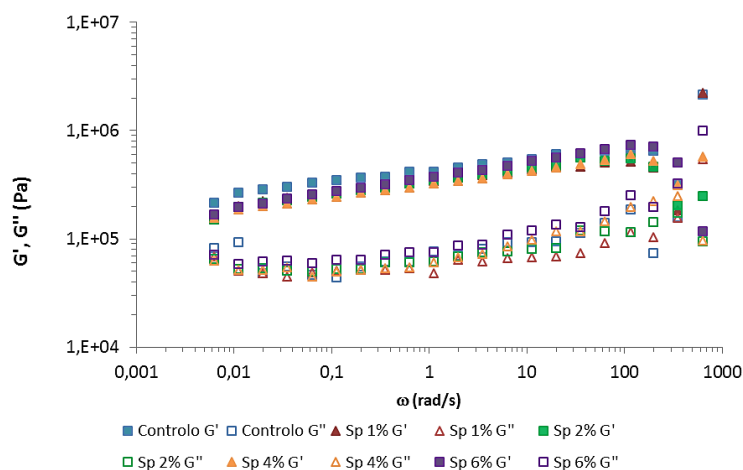


Figura 3.22 Espectro mecânico das massas das formulações de bolachas salgadas Controlo, 1% *Spirulina*, 2% *Spirulina*, 4% *Spirulina* e 6% *Spirulina*.

Através da análise da figura 3.22, é possível observar que o valor do módulo elástico (G') é sempre superior ao módulo viscoso (G''), indicando a predominância de um comportamento elástico.

Observa-se também que há uma acentuada dependência da frequência e a diferença entre os valores de G' e G'' é inferior a uma década, o que indica um material pouco estabilizado.

Na figura 3.23, encontram-se os valores de G' para cada uma das formulações de bolachas salgadas controlo e com incorporação de 1%, 2%, 4% e 6% de *Spirulina*.

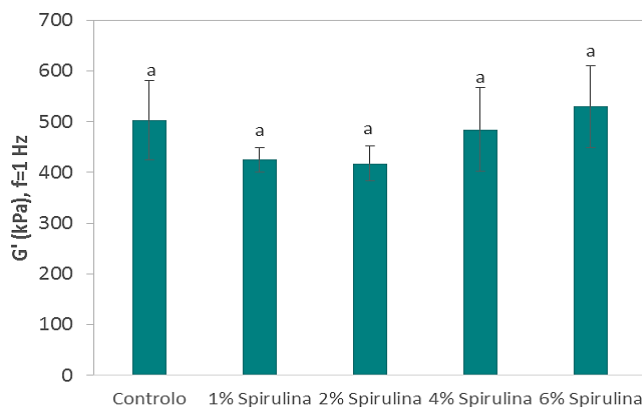


Figura 3.1103 Valores de G' a 1 Hz para as formulações de bolachas salgadas Controlo, 1% *Spirulina*, 2% *Spirulina*, 4% *Spirulina* e 6% *Spirulina*.

Ao analisar os valores obtidos de G' apresentados na figura 3.23, é possível verificar que não existem diferenças significativas ($p>0,05$) entre as várias formulações de bolachas salgadas. Parece evidente que o comportamento reológico é pouco afetado pela presença de *Spirulina*. Na realidade, a microestrutura destas massas deverá ser altamente dependente da presença do emulsionante, lecitina de soja, sem a presença do qual seria muito difícil laminar e moldar as bolachas. A adição de emulsionantes é uma prática comum no desenvolvimento de bolachas sem glúten, mesmo no caso de bolachas doces (e.g. Carrilho, 2014), bem como a mistura de várias farinhas, o uso de amidos, isolados proteicos e outros aditivos. Neste trabalho a opção foi utilizar, dentro do possível a mesma formulação otimizada para bolachas de farinha de trigo com *Spirulina*, tanto doces (Batista et al., 2017) como salgadas (Batista et al., submetido), de forma a avaliar o efeito da substituição de farinha de trigo por farinha de arroz.

3.4. Avaliação das características químicas das bolachas doces e salgadas com 2% de *Spirulina*

A avaliação das características químicas das bolachas foi feita de acordo com os métodos descritos no capítulo 2.2.5. Estas análises foram apenas realizadas para as amostras controlo e com 2% de *Spirulina* (doces e salgadas) pois foram aquelas que revelaram maior potencial em termos de apreciação sensorial. Durante o período de realização desta tese foram apenas realizadas provas informais pelos elementos da equipa de investigação,

estando neste momento as amostras em análise em laboratório externo para certificação de isenção de glúten do produto (< 20 ppm).

Tabela 8. Composição química das bolachas doces controlo e com incorporação de 2% de *Spirulina* e das bolachas salgadas controlo e com incorporação de 2% de *Spirulina*.

	Proteína (%)	Gordura total (%)	Humidade (%)	Cinza (%)	Fibra total (%)	Hidratos de carbono (%) **	Energia (Kcal/100 g)
Bolachas doces controlo	5,4 ± 0,2 ^a	14,3 ± 0,3 ^a	3,4 ± 0,2 ^a	1,3 ± 0,1 ^a	2,0 ± 0,5 ^a	74,3	447,1
Bolachas doces 2% <i>Spirulina</i>	6,7 ± 0,1 ^b	14,7 ± 0,8 ^a	3,5 ± 0,2 ^a	1,4 ± 0,0 ^a	1,1 ± 0,1 ^b	72,7	449,9
Bolachas salgadas controlo	7,7 ± 0,1 ^c	10,0 ± 0,7 ^b	2,5 ± 0,1 ^b	2,9 ± 0,3 ^b	1,7 ± 0,3 ^a	75,0	420,8
Bolachas salgadas 2% <i>Spirulina</i>	9,9 ± 0,0 ^d	9,5 ± 1,1 ^b	1,7 ± 0,1 ^c	2,7 ± 0,2 ^b	2,4 ± 0,3 ^a	73,9	420,7

* Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferenças significativas (p<0.05).

** A composição em hidratos de carbono foi calculada por diferença dos outros componentes.

Na Tabela 8 apresentam-se os dados referentes à composição química das bolachas analisadas (Tabela 8). Verifica-se um aumento significativo (p<0,05) no teor de proteína com a incorporação de 2% de *Spirulina* em relação ao controlo, de 5,4% para 6,7% nas bolachas doces e de 7,7% para 9,9% nas bolachas salgadas. Estes resultados estão de acordo com a composição química da biomassa da microalga *A. platensis* F&M C256, apresentados na tabela 3, sendo possível verificar que o nutriente em maior percentagem é a proteína (68,9%), de seguida os hidratos de carbono (12,8%), depois os lípidos (10,7%) e por fim as cinzas (6,1%). Também é possível notar que o aumento do teor proteico é maior na bolachas doces do que nas bolachas salgadas, devido a estas últimas possuírem também maior teor de farinha de arroz na sua formulação.

Em relação aos parâmetros de gordura total, cinza e fibra não existem diferenças significativas (p>0,05) entre as bolachas salgadas ou doces controlo e as bolachas com 2% de *Spirulina*, exceto na bolacha doce 2% *Spirulina* que apresenta um valor mais baixo do que o Controlo, indicando um possível erro associado ao método. No caso da humidade, verifica-se apenas diferença (p<0,05) para as bolachas salgadas.

De um modo geral, verifica-se que as bolachas salgadas têm maior teor proteico e de fibra, bem como menor teor de gordura do que as bolachas doces, o que as torna nutricionalmente mais interessantes. No entanto, o teor mais elevado de cinzas deverá estar associado a um teor de sal mais elevado. Através do Regulamento (UE) nº 1169/2011 foi possível fazer uma estimativa do valor de energia metabolizável das bolachas, obtendo-se um

valor de cerca de 450 Kcal/100g para as bolachas doces e 420 Kcal/100g para as bolachas salgadas, não havendo diferenças assinaláveis com a incorporação de *Spirulina*.

Ao comparar a composição química das bolachas doces controlo sem glúten com a composição química das bolachas doces controlo de trigo apresentados em Batista, *et al.* (2017), é possível verificar que as bolachas de arroz apresentam maior teor de proteína (5,4% vs. 3,8%) e menor teor de gorduras (14,3% vs. 16,1%) e cinzas (1,3% vs. 2,7%) em relação às bolachas de trigo. No que diz respeito às bolachas salgadas sem glúten, comparando com as bolachas salgadas com trigo (Batista *et al.*, submetido) é possível verificar que as bolachas controlo de arroz apresentam menor teor proteico (7,7% vs. 9,3%) e de fibra total (1,9% vs. 5,0%) em relação às bolachas controlo de trigo. Isto poderá dever-se ao fato de as bolachas salgadas conterem maior quantidade de farinha na sua composição, o que diferencia mais ao utilizar farinha de trigo ou farinha de arroz, devido à ausência de glúten, bem como à presença de lecitina na formulação sem glúten.

Compararam-se os valores de composição química das bolachas desenvolvidas com farinha de arroz com a composição nutricional de “bolacha de manteiga” com farinha de trigo e de bolachas tipo *cracker* de farinha de trigo que constam na tabela nutricional dos alimentos (2017) do Instituto Dr. Ricardo Jorge, uma vez que não existe nesta base de dados informação referente a bolachas sem glúten. Relativamente às bolachas de manteiga, é referenciado um valor de 6,4 % de proteína, que é comparável ao valor da bolacha de arroz com 2% de *Spirulina* (6,7%). As bolachas doces de arroz desenvolvidas (controlo e 2% *Spirulina*) apresentam ainda um teor de gordura bastante mais baixo (14,3-14,7% vs. 21,3%) bem como menor teor de fibra (1,1-1,4% vs. 3,1%) que a referência de trigo. Isto deve-se ao fato de se utilizar creme vegetal em vez de manteiga e arroz em vez de trigo. É de realçar que a utilização de apenas 2% de *Spirulina* permite colmatar o défice proteico que a bolacha de arroz controlo (5,4%) apresenta em relação à referência de trigo.

Comparando as bolachas salgadas de farinha de arroz (controlo e 2% *Spirulina*) com as bolachas *crackers* de farinha de trigo que constam na tabela nutricional dos alimentos (2017) do Instituto Dr. Ricardo Jorge, verificam-se resultados semelhantes. Ou seja, utilizando 2% de *Spirulina* obtém-se um teor proteico de 9,9%, semelhante à referência de trigo (10,8%), que permite colmatar o défice proteico da bolacha de arroz controlo (7,7%). À semelhança das bolachas doces, os valores de gordura das *crackers* de arroz são muito mais baixos que a referência de trigo (9,5-10% vs. 16,2%), o que é nutricionalmente vantajoso. No entanto o teor de fibra total também é mais baixo que a referência (1,9-2,3% vs. 3,0%) embora esta diferença seja menos acentuada do que no caso das bolachas doces.

Em conclusão, o aumento do teor de proteína ao incorporar 2% de *Spirulina* representa uma mais-valia em produtos sem glúten, uma vez que normalmente estes são mais pobres em proteína e outros nutrientes, pelo que a adição de *Spirulina* revela-se benéfica.

Capítulo 4 – Conclusões e proposta de trabalho de futuro

A incorporação da microalga *Spirulina* nas bolachas doces e salgadas resultou de uma forma geral em bolachas mais saudáveis, com maior estrutura e uma cor mais atrativa.

As bolachas doces ou salgadas apresentaram uma tonalidade verde que torna significativamente mais escura (diminuição de L^*), menos verde (aumento de a^*) e menos amarela (diminuição de b^*) com o aumento da concentração de *Spirulina*, mantendo no entanto a tonalidade constante (*hue angle* h°). De um modo geral, em relação à textura as bolachas com incorporação de *Spirulina* revelaram maior firmeza e ao reduzir o teor de farinha de arroz, esta diminuiu.

Em todas as bolachas, tanto doces como salgadas, o valor de atividade de água (a_w) observado foi inferior a 0,5, o que comprova a grande estabilidade destes produtos.

Em relação às propriedades reológicas das massas, verificou-se que para todas as formulações analisadas, o módulo G' era superior ao módulo G'' , o que traduz um comportamento predominantemente elástico. O valor dos módulos aumentou com o aumento da frequência, revelando uma dependência acentuada da mesma. As formulações de bolachas doces 4% e 6% *Spirulina* e 47% farinha de arroz mostraram-se as mais estruturadas. No entanto, nas bolachas salgadas não houve diferenças significativas de estruturação entre as amostras, demonstrando o contributo essencial da lecitina de soja como emulsionante na formulação das bolachas.

No estudo da diminuição do teor de farinha de arroz nas bolachas doces foi possível reduzir de 47% para 42%, mantendo a concentração de *Spirulina* fixa em 2%, de modo a manter os valores de G' e G'' semelhantes aos da massa controlo de trigo (produto-alvo).

Também se verificou que todas as formulações analisadas apresentavam um comportamento reofluidificante, devido à viscosidade diminuir com a velocidade de deformação, sendo que a formulação de bolacha doce 6% *Spirulina* apresentou maior viscosidade aparente.

Em relação à composição química, onde se verificou maior diferença foi no teor proteico, observando-se um aumento significativo ($p < 0,05$) entre as bolachas controlo e as

bolachas com 2% de *Spirulina*, aumentando de 5,4 para 6,7 g/100g nas bolachas doces e de 7,7 para 9,9 g/100g nas bolachas salgadas.

No que concerne à comercialização deste tipo de produto, há que ter em conta uma embalagem barreira à luz e ao vapor de água, de modo a evitar a detioração das bolachas por oxidação e amolecimento. Deverão ser realizados de futuro ensaio de estabilidade do produto ao longo do tempo, bem como ensaios de avaliação de análise sensorial.

De acordo com os resultados obtidos ao longo da elaboração da presente tese são também propostos os seguintes trabalhos futuros:

- Otimização da redução do teor de farinha de arroz para valores intermédios aos analisados, de modo a obter uma massa menos adesiva.
- Desenvolvimento de bolachas salgadas tipo “crackers” com outras microalgas aprovadas para consumo humano.
- Desenvolvimento de bolachas salgadas tipo “crackers” com recurso a outros emulsionantes diferentes da lecitina de soja.

Referências bibliográficas

- Abdulqader, G.; Barsanti, L.; Tredici, M. R. . (2000) *Harvest of Arthrospira platensis from Lake Kossorom (Chad) and its household usage among the Kanembu*, *Journal of Applied Phycology*, 12, pp. 493–498.
- Bao, J. e Bergman, J. (2004) *Starch in Food: structure, function and application*. CRC Press LLC, pp. 258–269.
- Barnes, H. A. (2000) *A handbook of elementary rheology*. 1^a. Wales: The University of Wales Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, Department of Mathematics, University of Wales.
- Barnes, Hutton e Walters (1989) *An Introduction to Rheology*. 1^a. Amsterdam. Elsevier Science publishers.
- Batista, A. P.; Gouveia, L.; Bandarra, N. M.; Franco, J. M.; Raymundo, A. (2013) *Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products*, *Algal Research*, 2(2), pp. 164–173.
- Batista, A.P.; Niccolai, A.; Bursic, I.; Rodolfi, L.; Biondi, N.; Tredici, M.R.; Sousa, I.; Raymundo, A. *Microalgae biomass incorporation in savoury food bioproducts as functional ingredients*, *Submetido para apresentação no Congresso Internacional Algae Europe 2017, a realizar em Berlim, Alemanha, de 5 a 7 de Dezembro de 2017*.
- Batista, A. P. (2012) *Natural pigments and microalgal biomass in colloidal food systems: rheological characterization*, *Historia*. Universidad de Huelva.
- Batista, P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodol, L., Biondi, N., Tredici, M. R., Sousa, I. e Raymundo, A. (2017) *Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility*, *Algal Research*, pp. 161–171.
- Becker, E. W. (2004) *Microalgae in human and animal nutrition*. In *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Ed. A. Richmond. Blackwell Publishing Ltd.
- Bhattacharya, R., K. (1979) *Gelatinization temperature of rice starch and its determination*, *Proceedings of the Workshop on Chemical Aspects of Rice Grain Quality*, 24 (7), pp. 116–118.
- Briffaz, A., Mestres, C., Escoute, J., Lartaud, M. e Dornier, M. (2012) *Starch gelatinization distribution and peripheral cell disruption in cooking rice grains monitored by microscopy*,

Journal of Cereal Science. 56(3), pp. 699–705.

Calvo, C. e Salvador, A. (2000) *Use of natural colorants in food gels. Influence of composition of gels on their colour and study of their stability during storage*, *Food Hydrocolloids*, 14(5), pp. 439–443.

Carrilho, L. (2014) *Bolachas sem glúten a partir de subprodutos da indústria* Laura Sofia Fernandes Baptista Carrilho *Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia alimentar*. Instituto Superior de Agronomia.

Castellar, M.R., Obón, J.M & Fernández-López, J. A. (2006) *The isolation and properties of a concentrated red-purple betacyanin food colourant from Opuntia stricta fruits*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, pp. 122–128.

Cauvain, S. e Young, L. (2008) *Bakery Food Manufacture and Quality: Water Control and Effects*. 2ª. Wiley-Blackwell. Buckinghamshire.

Challenges and Prospects Wang, Y. (2013) *Microalgae as the Third Generation Biofuel Production , Usage , Challenges and Prospects*, pp. 1–31.

Christian, E. e Vaclavick, V. (2014) *Essentials of Food Science*. 4ª. Springer. Texas.

Day, L. e Golding, M. (2016) *Food Structure, Rheology, and Texture, Reference Module in Food Science*. Elsevier.

Dewapriya, P. e Kim, S. (2014) *Marine microorganisms: An emerging avenue in modern nutraceuticals and functional foods*, *Food Research International*. 56, pp. 115–125.

Dhankhar, P. (2004) *Rice milling, RICE: Chemistry and Technology*, 4(5), p. 640.

Draaisma, R. B., Wijffels, R. H., Slegers, P. M., Brentner, L. B., Roy, A. e Barbosa, M. J. (2013) *Food commodities from microalgae*, *Current Opinion in Biotechnology*, 24(2), pp. 169–177.

Enzing, C., Ploeg, M., Barbosa, M. e Sijtsma, L. (2014) *Microalgae-based products for the food and feed sector: an outlook for Europe*, *JRC Scientific and Policy Reports*.

FAO (2017) *Food and Agriculture Organization*. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize> (Acedido: 1 de Março de 2017).

Foodmanufacture (2017) *Gluten-free market to grow faster than ever*, *Inside food & drink manufacturing*. Disponível em: http://www.foodmanufacture.co.uk/Ingredients/Gluten-free-market-to-grow-faster-than-ever?utm_source=newsletter_daily&utm_medium=email&utm_campaign=GIN_NId&c=UN2FfYlwuEaGf7g%2FUk9vfQ4lBdyZZIJU&p2=.

- Fragoso, S. (2016) *Desenvolvimento de bolachas com incorporação de diferentes microalgas*. Dissertação para a obtenção de grau de mestre em Engenharia alimentar. Instituto Superior de Agronomia.
- Freire, D. (2002) *Controlo de qualidade de óleos vegetais comercializados na região do grande Porto*, p. 4.
- Fuller, G. (2011) *New Food Product Development - From concept to marketplace*. 3^a. C. Press. New York.
- Glabe, E., Anderson, P. e e Laftsidis, S. (1984) *Potato snacks and method of preparation*. Patente. EUA.
- Gouveia, L., Batista, A., Miranda, A., Empis, J. e Raymundo, A. (2007) *Chlorella vulgaris biomass used as colouring source in traditional butter cookies*, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, pp. 433–436.
- Gouveia, L., Batista, A. P., Sousa, I., Raymundo, A. e Bandarra, N. M. (2008) *Microalgae in Novel Food Products*, *Nova Science Publishers*.
- Gouveia, L., Coutinho, C., Mendonça, E., Batista, A. P., Sousa, I., Bandarra, N. M. e Raymundo, A. (2008) *Functional biscuits with PUFA- ω 3 from Isochrysis galbana*, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 13(2), pp. 125–135.
- Guimarães, L. P. C. (2012) *Projeto e construção de um fotobiorreator para crescimento acelerado de microalgas*, *Dissertação de mestrado*. Universidade do Minho.
- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (2017) *Tabela da Composição de Alimentos*. Disponível em: <http://portfir.insa.pt/foodcomp/food?531> (Acedido: 6 de Março de 2017).
- Ivers, J. (1985) *Formulation of dough-based fried snack foods*. Patente. EUA.
- Ju, Y. e Vali, S. (2005) *Rice bran oil as a potencial resource for biodiesel: A review*, *Journal of Scientific & Industrial Research*, (64).
- Kaushal (2012) *Food Science and Technology (LWT)*, 48, pp. 59–68.
- Laureati, M., Giussani, B. e Pagliarini, E. (2012) *Sensory and hedonic perception of gluten-free bread: Comparison between celiac and non-celiac subjects*, *Food Research International*, 46(1), pp. 326–333.
- Leach, McCowen e Schoch (1959) *Cereal Chemistry*, 6, pp. 534–544.
- Lee, A. e Newman, J. M. (2003) *Celiac diet: Its impact on quality of life*, *Journal of the American Dietetic Association*, 103(11), pp. 1533–1535.

- Loureiro, J. (2015) *Impacto da granulometria do farelo de arroz nas características tecnológicas e sensoriais de alimentos sem glúten*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia.
- Machado, A. (2011) *Implementação de um Método para a Determinação de Hidrocarbonetos Alifáticos Saturados em Óleo de Girassol por Cromatografia Gasosa*. Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Alimentar. Instituto Superior de Agronomia.
- Mancebo, C. M., Rodriguez, P. e Gómez, M. (2016) *Assessing rice flour-starch-protein mixtures to produce gluten free sugar-snap cookies*, *LWT - Food Science and Technology*, 67, pp. 127–132.
- Martins, F. Pinho, O. Ferreira, I. (2004) *Alimentos funcionais: conceitos, definições, aplicações e legislação*, 10, pp. 67–78.
- Metzger e G., T. (2002) *The Rheology Handbook*. Vincentz.
- Missbach, B., Schwingshackl, L., Billmann, A., Mystek, A., Hickelsberger, M., Bauer, G. e König, J. (2015) *Gluten-free food database: the nutritional quality and cost of packaged gluten-free foods*, *PeerJ*, 3, p. 1337.
- Niccolai, A. (2016) *Microalgae as source of innovative foods and nutraceuticals*. PhD Thesis. University of Florence, Italy.
- Portugal (1979) *Ministérios do Comércio e Turismo. Portaria nº 762, 31 de Dezembro de 1979. Produção e comercialização de açúcar no continente. Diário da República, I Série, Nº 300.*
- Portugal (1998) *Ministérios da Economia, da agricultura, do desenvolvimento rural e das pescas e da saúde. Portaria nº 947, 3 de Novembro de 1988. Características das margarinas e outras emulsões gordas de gorduras e óleos vegetais e/ou animais não láteas destinadas à alimentação.*
- Raymundo, A., Batista, A. P., Nunes, C., Sousa, I., Bandarra, N. M. e Gouveia, L. (2011) *Utilização de microalgas com ingredientes funcionais em alimentos com diferentes níveis de processamento*, *Engenharia dos Biosistemas*, 1(9), pp. 337–340.
- Regulamento (UE) n.º 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 27 de Janeiro de 1997 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares.*
- Regulamento (UE) nº 2015/2283 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 25 de novembro de 2015 relativo a novos alimentos, que altera o Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho e que revoga o Regulamento (CE) nº 258/97 do Parlamento.*

- Roy, P., Orikasa, T., Okadome, H., Nakamura, N. e Shiina, T. (2011) *Processing conditions, rice properties, health and environment, International Journal of Environmental Research and Public Health*, 8(6), pp. 1957–1976.
- Santos, A. e Faraoni, A. S. (2008) *Efeito dos métodos de conservação , tipos de embalagem e tempo de estocagem na coloração de polpa de manga “ Ubá ” produzida em sistema orgânico*, *Ceres*, 55(6), pp. 504–511.
- Sili, C.; Giuseppe, T.; Vonshak, A. (2012) *Arthrospira (Spirulina)*, em *Ecology of Cyanobacteria II*, pp. 677–705.
- Tako, M. e Hizukuri, S. (1999) *Gelatinization mechanism of rice starch*, *Journal of carbohydrate chemistry*, 18(5), pp. 573–584.
- Thompson, T., Dennis, M., Higgins, L. A., Lee, A. R. e Sharrett, M. K. (2005) *Gluten-free diet survey: Are Americans with coeliac disease consuming recommended amounts of fibre, iron, calcium and grain foods?*, *Journal of Human Nutrition and Dietetics*, 18(3), pp. 163–169.
- Torbica, A., Hadnadev, M. e Dapčević Hadnadev, T. (2012) *Rice and buckwheat flour characterisation and its relation to cookie quality*, *Food Research International*, 48(1), pp. 277–283.
- Torres, M. D., Arufe, S., Chenlo, F. e Moreira, R. (2016) *Coeliacs cannot live by gluten-free bread alone - every once in awhile they need antioxidants*, *International Journal of Food Science and Technology*, pp. 81–90.
- Torres, M. D., Fradinho, P., Raymundo, A. e Sousa, I. (2014) *Thermorheological and Textural Behaviour of Gluten-Free Gels Obtained from Chestnut and Rice Flours*, *Food and Bioprocess Technology*, 7(4), pp. 1171–1182.
- Vaz, B., Moreira, J., Morais, M. e Costa, J. (2016) *Microalgae as a new source of bioactive compounds in food supplements*, *Current Opinion in Food Science*, 7, pp. 73–77.
- Wageningen University & Research (2017) *Unusual research paper about design and construction algae pilot plant*. Disponível em: <https://www.wur.nl/en/newsarticle/Unusual-research-paper-about-design-and-construction-algae-pilot-plant.htm#> (Acedido: 5 de Abril de 2017).

Anexos

The multi- disciplinary science of Rheology

Towards
a healthy and
sustainable
development

ISBN 978-84-697-5123-7

Edited by:

M. J. Hernández,
T. Sanz, A. Salvador,
F.J. Rubio-Hernández, R. Steinbrüggen

Rheological characterization of *Spirulina* gluten-free cookie doughs

A.P. Batista, I. Bursic, A. Miranda, S. Fragoso, P. Fradinho, A. Raymundo, I. Sousa

LEAF-Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa (Portugal)

Introduction

Spirulina (*Arthrospira platensis*) is a cyanobacteria widely used in human nutrition due to its nutritional properties - rich in proteins, gamma-linolenic acid (GLA), vitamins (e.g. B₁₂) and phycobilliproteins. Besides this, the addition of *Spirulina* has been associated to both positive [1] and negative [2] structural effects in different food matrixes (pastas and gelled desserts, respectively). Therefore a thorough investigation is needed to assess the rheological and microstructural implications of *Spirulina* addition in food systems, namely its potential in the challenging design of gluten-free products.

Experimental

Sweet cookie doughs were prepared with wheat and rice (gluten-free) flours, according to a previously optimised formulation [3]. *Spirulina* biomass (lyophilised) was added at 2, 4 and 6%, replacing the corresponding amount of flour. Furthermore, *Spirulina* concentration was kept constant (2% for rice and 6% for wheat) while the flour concentration was reduced and replaced by water. Formulations are presented in Tables 1 and 2. All percentages in the paper are based in mass ratio, expressed as weight/weight (w/w).

The ingredients were kneaded in a food processor for 60 s and moulded in 4 mm height sheets. Fresh cookie doughs were immediately analysed in a controlled-stress rheometer (Haake, RS-75), using serrated parallel plates (20 mm Ø) geometry with 1 mm gap, using the small amplitude oscillatory system, i.e. within the linear viscoelastic behaviour. Stress sweeps were carried out at 1 Hz to determine the linear viscoelastic region (LVR). Frequency sweep tests were then performed at a constant stress within the LVR (60-130 Pa), from 0.01 to 100 Hz.

Wheat flour, rice flour and *Spirulina* water and oil absorption capacities were also determined as described in [4].

All experiments were carried out at 20°C, in triplicate. ANOVA Post-Hoc comparison at 95% probability level was performed by Scheffé Test.

Table 1. Wheat flour cookie dough formulations (% w/w)

	C	F2	F4	F6	F6A	F6B
<i>Spirulina</i>	0	2	4	6	6	6
Wheat Flour	49	47	45	43	40	37
Water	10	10	10	10	13	16
Baking powder	1	1	1	1	1	1
Margarine	20	20	20	20	20	20
Sugar	20	20	20	20	20	20

Table 2. Rice flour cookie dough formulations (% w/w)

	C	F2	F4	F6	F2A	F2B	F2C	F2D
<i>Spirulina</i>	0	2	4	6	2	2	2	2
Wheat Flour	49	47	45	43	44	42	40	38
Water	10	10	10	10	13	15	17	19
Baking powder	1	1	1	1	1	1	1	1
Margarine	20	20	20	20	20	20	20	20
Sugar	20	20	20	20	20	20	20	20

Results and Discussion

From the rheological mechanical spectra, presented in Fig. 1, a predominantly elastic behavior is observed for wheat flour-*Spirulina* sweet cookie doughs, with G' always higher than G'' . For all samples, a dependence of the viscoelastic moduli with frequency is evident, with a tendency for moduli crossover both at lower and higher frequency values.

A linear increase in the wheat cookie dough's viscoelastic moduli, with *Spirulina* concentration was observed, as presented for G' values at 1 Hz frequency in Fig. 2 ($R^2=0.97$). This indicates that *Spirulina* incorporation can play a significantly role on the cookie dough structure development. These results are in agreement with higher texture parameters found for 6% *Spirulina* cookies in a previous study [3], which may be related to its high protein content and high water absorption capacity.

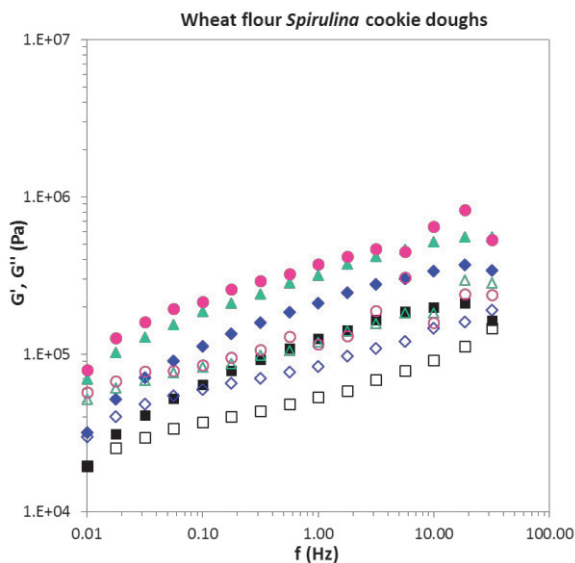


Figure 1. Mechanical Spectra of wheat flour (WF) cookie doughs with different *Spirulina* (Sp) contents (w/w): ■ 0 %Sp (control, 49% WF), ♦ 2% Sp (47% WF), ▲ 4% Sp (45% WF) and ● 6% Sp (43% WF). G': closed symbol, G'' open symbol.

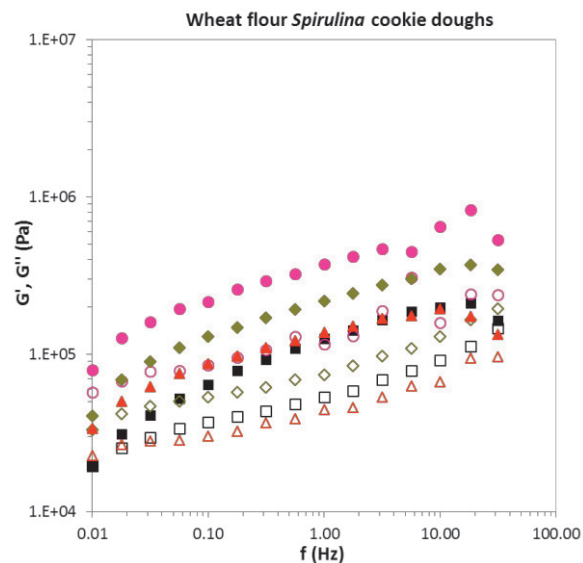


Figure 3. Mechanical Spectra of cookie doughs with 6% *Spirulina* (Sp) and different wheat flour (WF) contents (w/w): ■ 49% WF (control, 0% Sp), ● 43% WF (6% Sp), ♦ 40% WF (6% Sp), ▲ 37% WF (6% Sp). G': closed symbol, G'' open symbol.

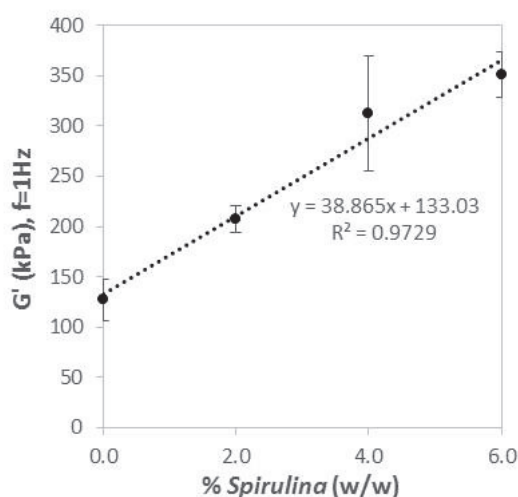


Figure 2. Evolution of viscoelastic moduli, at 1 Hz frequency (from frequency sweep tests), of wheat flour cookie doughs with increasing *Spirulina* contents.

Therefore, the possibility to reduce wheat flour content in the cookie dough formulation (replacing flour by water), while adding 6% *Spirulina*, was also evaluated.

From the resulting mechanical spectra (Fig. 3) it is evident that, with 6% *Spirulina*, reducing wheat flour from 43% to 40% results in a dough with significantly lower ($p < 0.05$) G' values (351 vs. 222 kPa, at $f = 1$ Hz) but still significantly higher than the control (49% flour, 0% *Spirulina*) (222 vs. 127 kPa, at $f = 1$ Hz).

Further decreasing the wheat flour content down to 37%, with 6% *Spirulina*, resulted in a cookie dough with viscoelastic parameters similar ($p > 0.05$) to the 49% wheat flour control. Nevertheless, due to the high water content (16%), this sample was quite sticky and difficult to manipulate.

These results are interesting and demonstrate the potential application of *Spirulina* biomass as techno-functional ingredient in bakery products. This *Spirulina* structuring effect can be particularly useful in the challenging formulation of gluten-free product, where the absence of a viscoelastic gliadin-glutelin network usually results in products with poor texture and sensory properties.

From mechanical spectra (Fig. 4) it can be seen that rice flour doughs present viscoelastic moduli significantly higher ($p < 0.05$) than wheat flour (Fig. 3) doughs ($G'_{1\text{Hz}}$: 646 vs. 127 kPa for the rice and wheat control samples, respectively).

The addition of *Spirulina* to rice flour cookie doughs clearly contributed to a more elastic dough, with positive impact in the cookies sensory properties (results not shown). Even at the lowest alga concentration (2%) there is a pronounced structuring effect in relation to the control (52% increase in $G'_{1\text{Hz}}$), but when further increasing *Spirulina* content the differences are not statistically significant ($p < 0.05$) (Fig. 5).

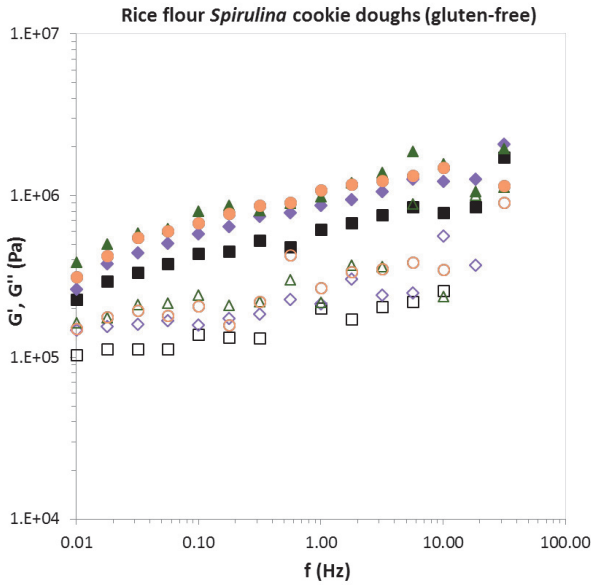


Figure 4. Mechanical Spectra of rice flour (RF) cookie doughs with different *Spirulina* (Sp) contents (w/w): ■ 0 %Sp (control, 49% RF), ◆ 2% Sp (47% RF), ▲ 4% Sp (45% RF) and ● 6% Sp (43% RF). G', closed symbol, G'' open symbol.

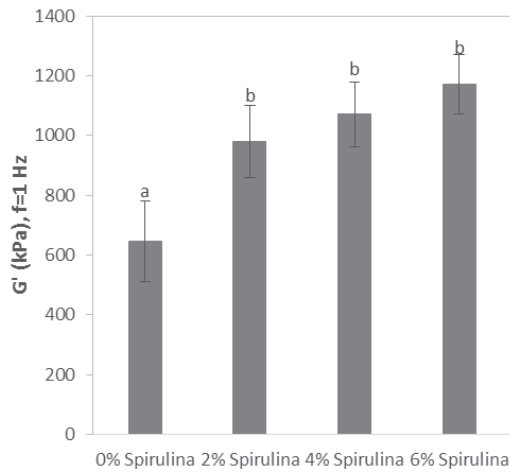


Figure 5. Values of G' , at 1 Hz frequency (from frequency sweep tests), of rice flour cookie doughs with different *Spirulina* contents. Different letters correspond to significant differences ($p < 0.05$).

A study on the potential of *Spirulina* to replace rice flour in cookie dough was carried out, similar to what was previously done with wheat flour (Fig. 3). In this case *Spirulina* was kept at only 2%, since there were no significant differences in the rice dough rheology for higher alga concentrations. By lowering rice flour content (and increasing water), in the presence of *Spirulina*, it was intended to attain formulations of doughs with viscoelastic properties similar to wheat flour doughs (target product).

Figure 6 presents the mechanical spectra of cookie doughs with 2% *Spirulina*, with observable viscoelastic functions decrease with decreasing rice flour contents.

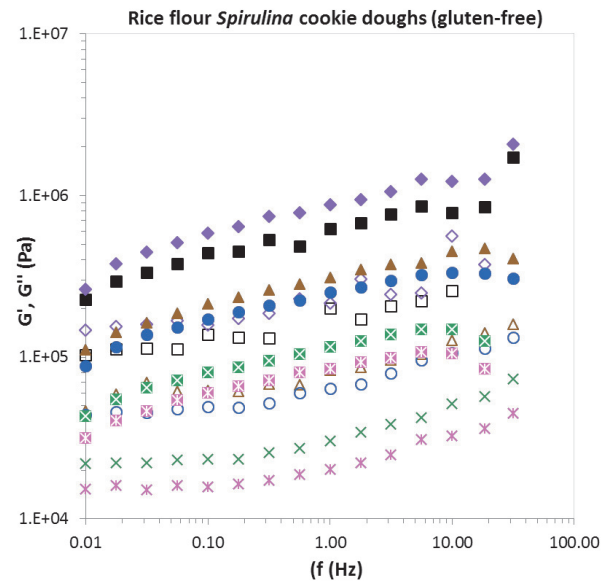


Figure 6. Mechanical Spectra of cookie doughs with 2% *Spirulina* (Sp) and different rice flour (RF) contents (w/w): ■ 49% RF (control, 0% Sp), ◆ 47% WF (2% Sp), ▲ 44% RF (2% Sp), ● 42% RF (2% Sp), × 40% RF (2% Sp), × 38% RF (2% Sp). G', closed symbol, G'' open symbol.

As expected, significant differences ($p < 0.05$) were found on G' values upon rice flour decrease from 47% ($G'_{1\text{Hz}} = 980 \text{ kPa}$) to 38% ($G'_{1\text{Hz}} = 81 \text{ kPa}$). The evolution of $G'_{1\text{Hz}}$ with rice flour follows an exponential behaviour ($R^2 = 0.96$) (Fig. 7). It should be noted that wheat flour samples showed $G'_{1\text{Hz}}$ values around 100 to 300 kPa, so with some of these formulation changes we achieved values close to the target products. However, the high water content of these samples (13-19%) makes them quite adhesive and therefore difficult to manipulate, so further studies should be focused on overcoming this aspect.

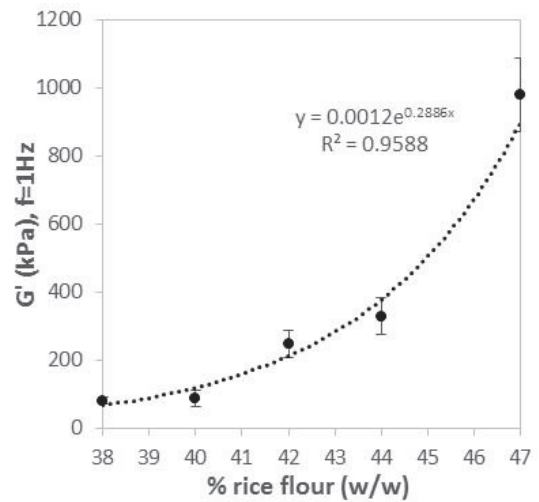


Figure 7. Evolution of viscoelastic moduli, at 1 Hz frequency (from frequency sweep tests), of *Spirulina* cookie doughs with increasing rice flour contents.

The observed techno-functional properties of *Spirulina* should be related to its high water and oil absorption properties (5.2 and 2.2, respectively) in relation to the flours (2.1-2.4 and 1.7, respectively), as can be observed in Fig. 8.

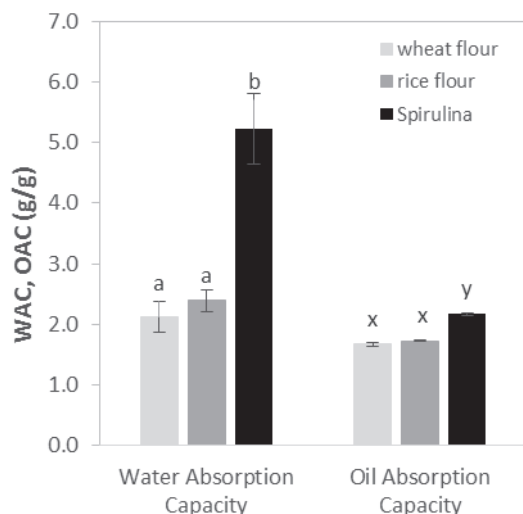


Figure 8. Water and oil absorption capacities of wheat flour, rice flour and *Spirulina*. Different letters correspond to significant differences ($p < 0.05$).

Conclusions

The use of *Spirulina* biomass as functional ingredient in bakery gluten-free products is thus promising. Besides potential bioactive and nutritional benefits, *Spirulina* presents very interesting structuring properties that can be applied for gluten-replacement or “mimicking” effects highly required in the design of coeliac-directed bakery products.

Acknowledgements

The authors thank Prof. Mario Tredici Research Group from DISPAA–University of Florence (Italy) for providing *A. platensis* biomass and for all collaboration in this research project. This work was supported by national funds from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Portugal) through the research unit UID/AGR/04129/2013 (LEAF). Patrícia Fradinho acknowledges her PhD grant from Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa and Ivana Bursic acknowledges Erasmus grant.

References

1. Fradique, M., Batista, A.P., Nunes, M.C., Gouveia, L., Bandarra, N.M., Raymundo, A. (2010). J. Sci. Food Agric. 90, 1656-1664.
2. Batista, A.P., Nunes, M.C., Fradinho, P., Gouveia, L., Sousa, I., Raymundo, A., Franco, J.M. (2012). J. Food Eng. 110, 182-189.

3. Batista, A.P., Niccolai, A., Fradinho, P., Fragoso, S., Bursic, I., Rodolfi, L., Biondi, N., Tredici, M.R., Sousa, I., Raymundo, A. (2017). Algal Research, Accepted
4. Raymundo, A., Fradinho, P., Nunes, M.C. (2014). Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre 3, 96–105.

Contact Address:

paulabatista@isa.ulisboa.pt
 LEAF – Linking Landscape, Environment, Agriculture and Food
 Instituto Superior de Agronomia
 Universidade de Lisboa
 Tapada da Ajuda. 1349-017 Lisboa. Portugal.
 Telf.: +351 213653100 Ext.: 2124

Anexo 1 (b) – Conferência SPASS 2017

A. Miranda, A.P. Batista, A. Raymundo, I. Sousa

No mundo atual em que vivemos, assistimos a uma constante preocupação com uma alimentação saudável que inclua alimentos benéficos para a saúde. A *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* é uma cianobactéria muito utilizada na alimentação humana que apresenta uma fonte valiosa de vitaminas, carotenóides, proteínas, ácidos gordos, esteróis, polissacáridos, entre outros compostos bioativos. Pode ser por isso considerada um ingrediente funcional ao ser incorporada em alimentos como as bolachas que sendo consumidas como *snack* são um produto conveniente, de fácil consumo e transporte. Por outro lado, tem-se observado o aumento do número de indivíduos com sensibilidade ao glúten, o que influencia a população em geral na procura de alimentos que não o contenham. A farinha de arroz é um ingrediente que pode ser utilizado nas bolachas sem glúten, pois apresenta boa digestibilidade, é hipoalergénico, isento de glúten, de sabor suave e a sua forma nativa apresenta diferentes características funcionais.

Desenvolveram-se várias formulações de bolachas doces a partir de uma formulação base previamente otimizada. Num primeiro ensaio, variou-se a concentração de biomassa de *Spirulina* liofilizada (Controlo, 2%, 4% e 6%), substituindo na concentração de farinha de arroz e num segundo ensaio variou-se o teor de farinha de arroz, mantendo a concentração de *Spirulina* a 2% (38%, 40%, 42% e 44%), substituindo no teor de água. Os ingredientes utilizados na preparação das bolachas foram a farinha de arroz, açúcar branco de cana, margarina (59% gordura), fermento químico em pó, água destilada e *Spirulina*. Os ingredientes foram misturados num robô de cozinha, as bolachas foram moldadas e levadas ao forno ventilado a uma temperatura controlada (110°C) durante 40 minutos. A massa das bolachas foi analisada quanto ao seu comportamento viscoelástico linear e as bolachas foram analisadas quanto às dimensões (diâmetro, espessura e spread-ratio), cor ($L^*a^*b^*$), a_w , humidade e textura (testes de *bending* e penetração).

Através dos resultados dos testes reológicos, observou-se que a adição de *Spirulina* contribuiu claramente para o aumento da elasticidade da massa, com um impacto positivo nas características sensoriais das bolachas. Observou-se também o aumento linear do módulo viscoelástico (G') com o aumento da concentração de *Spirulina* ($R^2=0.89$). Em relação à textura, as bolachas com adição de *Spirulina* também apresentaram sempre valores de dureza mais elevados que o controlo. Relativamente ao segundo ensaio, verificou-se uma redução exponencial em G' ao diminuir o teor de farinha de arroz ($R^2=0.96$), o que permitiu obter valores semelhantes às bolachas de trigo (produto-alvo) [5]. Através dos resultados dos testes de *bending*, também se observou que a dureza das bolachas diminuiu com a redução

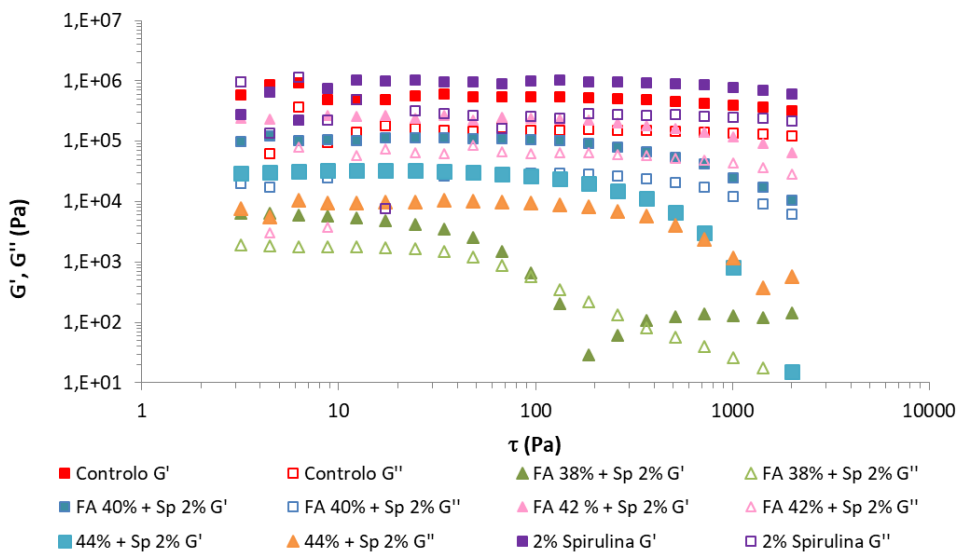
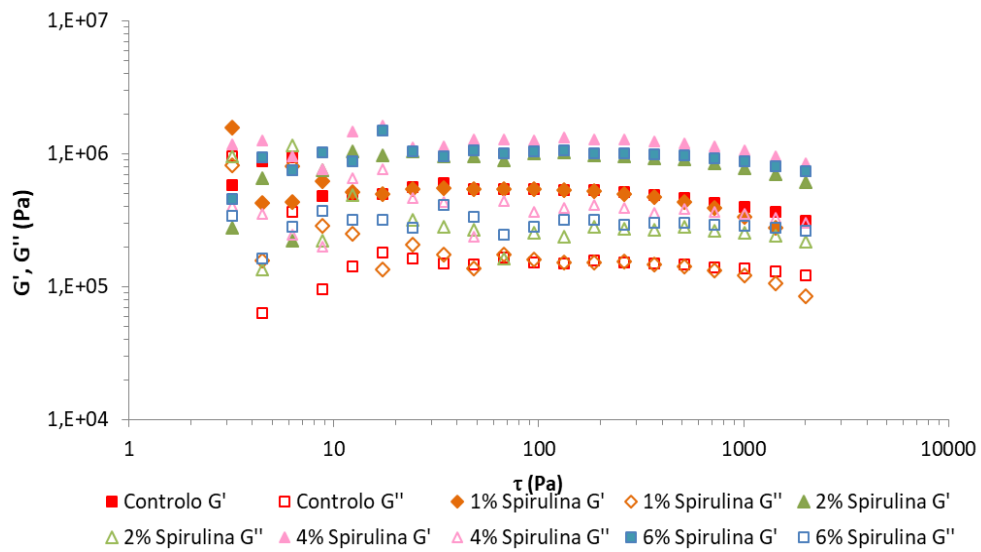
da concentração de farinha de arroz ($R^2=0.91$, linear) para uma concentração constante de *Spirulina* (2%).

Em todas as formulações de bolachas desenvolvidas, os valores de humidade e a_w foram sempre inferiores a 3,93% e 0,44, respetivamente, o que indica que estas bolachas poderão ter um tempo de prateleira longo.

A utilização da biomassa de *Spirulina* mostra-se bastante promissora em produtos de panificação sem glúten, conferindo a estrutura necessária a estes produtos ao atuar como um mimético do glúten.

Anexo 2 – Testes de varrimento de tensão

Bolachas doces



Bolachas salgadas

